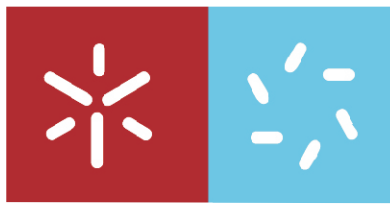


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Maria Rodrigues da Costa Brito

**O Oxigenio no Mundo Vivo:  
dos melhoramentos extraordinários aos  
efeitos deletérios**

Adequação de protocolos para a aplicação  
aos Ensinos Básico e Secundário



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Ana Maria Rodrigues da Costa Brito

**O Oxigenio no Mundo Vivo:  
dos melhoramentos extraordinários aos  
efeitos deletérios**

Adequação de protocolos para a aplicação  
aos Ensinos Básico e Secundário

Tese de Mestrado  
Mestrado em Evolução e Origem da Vida

Trabalho efectuado sob a orientação da  
**Prof. Doutora Olga Coutinho**

Novembro de 2006

## DECLARAÇÃO

NOME: Ana Maria Rodrigues da Costa Brito

ENDEREÇO ELECTRÓNICO: [anambrito@sapo.pt](mailto:anambrito@sapo.pt)

TELEFONE: 919657733

NÚMERO DO BILHETE DE IDENTIDADE: 6439580

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

**O Oxigénio no mundo vivo: dos melhoramentos extraordinários aos efeitos deletérios**

Adequação de protocolos para aplicação ao ensino básico e secundário

ORIENTADORA: Prof. Doutora Olga Coutinho

ANO DE CONCLUSÃO: 2006

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO: Evolução e Origem da Vida

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## AGRADECIMENTOS

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta tese foi realizado no departamento de Biologia da Universidade do Minho.

Gostaria de manifestar o reconhecimento a todos que, de uma forma directa ou indirecta, contribuíram para a sua realização.

Agradeço, em particular:

À minha orientadora, Prof. Doutora Olga Coutinho pelos ensinamentos, sugestões, apoio, entusiasmo e paciência que sempre manifestou em todas as etapas do trabalho. Fico ainda reconhecida pela sua disponibilidade e amizade demonstrada.

Aos investigadores do laboratório de Células Animais do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, pela amizade, informações e sugestões, em especial ao João Pedro pela sua disponibilidade.

À minha família por todos os sacrifícios que fez e toda a força que me deu durante todo o tempo que durou este mestrado, em especial à minha mãe, à tia São e à Gelinha.

A todos os meus amigos que me apoiaram nas horas difíceis e me deram coragem para continuar, em especial à Céu, à Ana Cristina, ao Aires e à Ângela; à minha professora de Biologia (Irene Barros) por todo o carinho e amizade que sempre demonstrou para comigo e por me ter “aberto” o caminho até aqui.

À Inês e ao Rui  
Por acreditarem em mim...



**O OXIGÉNIO NO MUNDO VIVO:  
DOS MELHORAMENTOS EXTRAORDINÁRIOS AOS EFEITOS DELETÉRIOS  
- Adequação de protocolos para aplicação aos Ensinos Básico e Secundário**

**RESUMO**

A acumulação de Oxigénio na atmosfera terrestre marcou um ponto de viragem na evolução, à cerca de 2,5GA. Por um lado, permitiu a formação da camada de ozono na estratosfera o que favoreceu a evolução dos seres vivos para o meio terrestre; por outro lado, a utilização deste gás no metabolismo como aceitador final dos electrões da cadeia respiratória mitocondrial, melhorou substancialmente o rendimento energético, tornando-se imprescindível para a maioria das espécies actuais. No entanto, apesar dos extraordinários melhoramentos em termos de evolução do metabolismo, o oxigénio é um gás tóxico, mutagénico e por isso altamente deletério para os seres vivos que o utilizam. A toxicidade do oxigénio é, actualmente, associada à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), cuja formação ocorre maioritariamente na mitocôndria. O stresse oxidativo é assim considerado como sendo um dos principais factores responsáveis por inúmeras doenças, neuronais e não neuronais, incluindo aterosclerose, isquémia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Alzheimer.

No âmbito deste tema, abrangente e actual, foram optimizados três protocolos experimentais passíveis de serem realizados em escolas do Ensino Básico/Secundário (Componente Científica). O protocolo I aborda o estudo do estado de oxidação/redução dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de electrões, na presença de diferentes substratos oxidáveis e inibidores específicos, e dirige-se preferencialmente aos alunos do 12º ano, inserido na disciplina de Área Projecto. A interpretação dos resultados a obter permite uma exploração aprofundada do mecanismo de transporte de electrões através da cadeia respiratória mitocondrial e daí inferir as vantagens do metabolismo oxidativo, do ponto de vista do rendimento energético e dos factores que, reversível ou irreversivelmente, o afectam. O protocolo II consiste numa metodologia simples de estudo da influência de factores físico-químicos na actividade enzimática da catalase (9º ano) e permite, adicionalmente, uma abordagem a respostas celulares em situações de stresse oxidativo e mecanismos naturais de defesa anti-oxidante (10º e 12º anos). O protocolo III desenvolve este tema a um nível mais avançado, aplicável apenas ao 12º ano, propondo a determinação quantitativa da actividade da catalase e uma introdução à interpretação da cinética enzimática. Permite explorar a importância do conhecimento dos parâmetros cinéticos e da utilização de modelos teóricos, para validação de resultados experimentais e sua aplicação na biotecnologia enzimática.

Na segunda parte desta dissertação (Componente Pedagógica) disponibilizam-se os referidos protocolos para utilização directa, por parte de professores e alunos, neles se indicando a respectiva inserção curricular.



**THE OXYGEN IN THE BIOLOGICAL WORLD:  
FROM THE EXTRAORDINARY IMPROVEMENT TO DELETERIOUS EFFECTS  
- Protocols adequacy for application in Basic and Secondary Teaching**

**ABSTRACT**

The accumulation of Oxygen in earth atmosphere was a mark during evolution, 2.5GA ago. On one hand, it allowed the formation of ozone layer, within the stratosphere, which had improved the biologic evolution to a landscape environment; on the other hand, the metabolic utilization of this gas, as final electron acceptor, by the mitochondrial respiratory chain, substantially improved the energetic yield, making it absolutely necessary for the majority of the actual biological species. Nevertheless, although the extraordinary improvement, in evolution terms, oxygen is a toxic gas, mutagenic and therefore highly deleterious for the organisms. Nowadays the oxygen toxicity has been associated to the production of reactive oxygen species (ROS), which formation essentially occurs at mitochondrial level. The oxidative stress has been considered as one of the main responsible factors for many neuronal and non-neuronal disorders, including atherosclerosis, brain ischemia, lateral amyotrophic sclerosis, and Parkinson and Alzheimer diseases.

On the scope of this subject, so actual and broader, three experimental protocols, to be implemented in Basic and Secondary schools, were optimized (Scientific Component). The protocol I introduces the study of the oxidation/reduction state of the mitochondrial respiratory complexes, in the presence of different oxidizing substrates and specific inhibitors. It is addressed specially to students on the 12<sup>th</sup> level, and can be inserted in the Project Area theme. The interpretation of results to be obtained will allow to go deeply into a discussion of how the mitochondrial respiratory chain works and conclude about the advantages of the oxidative metabolism, from the energetic yield point of view, as well as of the specific factors that can inhibit it. The protocol II includes a very simple methodology to study the influence of physico/chemical factors in catalase enzymatic activity (9<sup>th</sup> level). Additionally it allows the discussion of how cellular responses are involved in oxidative stress and how natural mechanisms of antioxidant defense work (10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> levels). The protocol III develops the same subject for a more advanced level (12<sup>th</sup> level), and proposes the quantitative determination of catalase activity as well as an introduction to enzymatic kinetics interpretation. The importance of kinetic parameters and the utilization of theoretical models, to validate experimental results, with application on enzymatic biotechnology, will be explored.

In the second part of this thesis (Pedagogic Component) the referred experimental protocols are available, for direct use for professors and students, together with a description of how they can be included in the respective discipline programmes.





## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ENQUADRAMENTO .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTE I: COMPONENTE CIENTÍFICA .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
O OXIGÉNIO NO MUNDO VIVO: .....	13
...DOS MELHORAMENTOS EXTRAORDINÁRIOS. ....	15
...AOS EFEITOS DELETÉRIOS. ....	35
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<i>Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES .....</i>	<i>55</i>
<i>Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE .....</i>	<i>58</i>
<i>Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA .....</i>	<i>61</i>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<i>Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES .....</i>	<i>67</i>
<i>Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE .....</i>	<i>78</i>
<i>Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....</i>	<i>84</i>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>PARTE II: COMPONENTE PEDAGÓGICA .....</b>	<b>101</b>
<i>Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES .....</i>	<i>103</i>
<i>Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE .....</i>	<i>113</i>
<i>Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA .....</i>	<i>125</i>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>149</b>
ANEXO A. CÁLCULO DO TEOR DE $H_2O_2$ DESTRUÍDO .....	151
ANEXO B. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	153
ANEXO C. ENZIMAS E CINÉTICA ENZIMÁTICA .....	157
ANEXO D. ALGUNS DADOS SOBRE ESPECTROFOTOMETRIA .....	169
ANEXO E. ALGUNS CONCEITOS SOBRE TERMODINÂMICA .....	177



## ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
APAF-1	Factor apoptótico (apoptotic peptidase activating factor 1)
$\text{Ase}^{\bullet-}$	Radical semidehidroascorbato
$\text{AsCH}^{\bullet}$	Radical ascorbato livre
atm	Atmosferas
ATP	Adenosina t rifosfato
Bcl-xL	Factor anti-apóptico
Bax	Proteína pró-apoptótica
cit.	Citocromo
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
CTE	Cadeia de Transporte de Electrões
$\text{Cu}^+$	Catão cobre
CuZn-SOD	Superóxido Dismutase com cobre e zinco
DNA	Ácido Desoxirribinucleico
DPIP	2,6- diclorofenolindofenol
EC - SOD	Superóxido Dismutase extracelular
FAD	Flavina-Adenina-Dinucleótido (forma oxidada)
$\text{FADH}_2$	Flavina-Adenina-Dinucleótido (forma reduzida)
$\text{Fe}^{2+}$	Catão férrico
$\text{Fe}^{3+}$	Catão ferroso
Fe-S	Grupos Ferro-Enxofre
FMN	Flavina-Mononucleótido (forma oxidada)
$\text{FMNH}_2$	Flavina-Mononucleótido (forma reduzida)
$\Delta G^\circ$	Variação de energia livre
GA	Giga-Anos ( $10^9$ anos)
Gpx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
$\text{H}^+$	Protão, catão hidrogénio
$\text{H}_2\text{O}$	Água

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogénio
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
mmHg	milímetros de Mercúrio
Mn-SOD	Superóxido Dismutase com manganésio
mol	Mole
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (forma reduzida)
•NO	Óxido nítrico
O	Oxigénio atómico
O <sup>•-</sup>	Anião superóxido
O <sub>2</sub>	Molécula de oxigénio
O <sub>3</sub>	Molécula de ozono
•OH	Radical hidroxilo
Pi	Fosfato inorgânico
Q	Coenzima Q, Ubiquinona oxidada
Q <sup>-</sup>	Ubiquinona semireduzida, Ubisemiquinona
QH <sub>2</sub>	Ubiquinona reduzida, Ubiquinol
ROS	Espécie Reactiva de Oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
UV	radiação Ultra-Violeta

## **ENQUADRAMENTO**



O curso de Mestrado em Evolução e Origem da Vida, onde se insere este trabalho de tese, visa, entre os seus principais objectivos, o aprofundamento de conhecimentos científicos, que actualmente evoluem vertiginosamente, e a transversalidade dos diferentes ramos das ciências experimentais, permitindo interrelacionar os conteúdos das diferentes disciplinas.

A mudança tecnológica acelerada e a globalização do mercado exigem indivíduos com educação abrangente em diversas áreas, que demonstrem flexibilidade, capacidade de comunicação e uma capacidade cada vez maior de aprender ao longo da vida. As revisões curriculares, quer do ensino básico quer do ensino secundário, afirmam a necessidade de aumentar a qualidade das aprendizagens de modo a que os alunos possam usar, de modo integrado, saberes culturais, científicos e tecnológicos. Esta qualidade de aprendizagem pressupõe, também, uma qualidade de ensino por parte de professores. Desta forma, este mestrado é extremamente importante para professores de Ciências dos Ensinos Básico e Secundário, por permitir uma actualização abrangente e integrada em diversos temas das Ciências.

O ensino das Ciências é considerado fundamental na sociedade actual. No Ensino Básico, o ensino das ciências, corresponde a uma preparação inicial (*in* Competências Específicas do Ensino Básico) e visa proporcionar aos alunos possibilidades de:

- despertar a curiosidade acerca do mundo natural à sua volta e criar um sentimento de admiração, entusiasmo e interesse pela Ciência.
- adquirir uma compreensão geral e alargada das ideias mais importantes e das estruturas explicativas da ciência, bem como dos procedimentos da investigação científica, de modo a sentir confiança na abordagem de questões científicas e tecnológicas.
- questionar o comportamento humano perante o mundo, bem como o impacto da Ciência e da Tecnologia no mundo que nos rodeia e na nossa cultura em geral.

No Ensino Secundário pretende-se reforçar as capacidades de abstracção, experimentação, trabalho em equipa, ponderação e sentido de responsabilidade o que permitirá o desenvolvimento de competências que caracterizam a Biologia como Ciência (*in* Competências a Desenvolver do Programa de Biologia/Geologia 10º e 11º anos). Deste modo destacam-se a promoção do raciocínio lógico e crítico associado ao desenvolvimento de competências; o estabelecimento de relações causa-efeito, a



compreensão da articulações estrutura-função e a exploração de diferentes interpretações em sistemas complexos permitindo a confrontação entre o previsto e o observado, a criatividade e o desenvolvimento de atitudes de curiosidade, humildade, cepticismo e análise crítica; a reflexão sobre a adequação das diversas soluções biológicas para as mesmas funções e a avaliação da adaptação de técnicas para o estudo de sistemas complexos podem ser desenvolvidas através de trabalho em equipa (com desenvolvimento de capacidades de renegociação de estratégias, procura de consensos, reforço da expressão verbal, da fundamentação, da compreensão, da cooperação e da solidariedade).

O reforço de competências técnicas e tecnológicas não constitui, em si mesmo, um objectivo primordial da implementação dos programas de ensino, porém, deve ser perspectivado como instrumental no processo de ensino-aprendizagem.

Em conformidade com este ensino e aprendizagem das ciências, a importância da reconceptualização do trabalho experimental é reconhecida e está associada ao movimento de reforma curricular em prol de uma abordagem abrangente da educação em ciências fundamentada num entendimento crítico do conhecimento e da aprendizagem – o construtivismo (Almeida, 2001). Segundo esta corrente de pensamento o trabalho experimental é visto como uma situação de aprendizagem significativa sendo de realçar:

- Em primeiro lugar a importância da teorização prévia e exploração das ideias existentes como os precursores necessários do trabalho experimental, ao nível da sua concepção, realização e exploração. Assim, e por um lado, evidencia-se que o trabalho experimental não se restringe à experimentação e observação, mas envolve a especulação teórica, o debate e confrontação de ideias na construção de um quadro teórico de referência que informará e determinará o desenho e a realização do plano experimental. Por outro lado, não se deve assumir a existência de um método científico único e universal. Pelo contrário, deve-se reconhecer a existência de uma multiplicidade de métodos e processos a seleccionar atendendo aos objectivos a atingir, aos conteúdos científicos em jogo, e aos contextos de aprendizagem.
- Em segundo lugar, o reconhecimento da aprendizagem como um processo simultaneamente pessoal e social. Ao admitir-se esta componente como fundamental, destaca-se a pertinência de o trabalho experimental ser concebido como uma actividade cooperativa de aprendizagem centrada no trabalho de grupo, em pequenos grupos e no grupo-turma, sendo de destacar a relevância que pode

assumir a discussão no seio de cada grupo e/ou grupo-turma ao nível da concepção e desenvolvimento do trabalho experimental.

Nesta perspectiva, o trabalho experimental deve ser entendido não como um processo linear que caminha inexoravelmente dos factos para as ideias, mas como um processo investigativo que envolve uma pluralidade de métodos e de explicações onde a criação, a invenção, a incerteza, a autocrítica, a heterocrítica e o erro podem desempenhar um papel fundamental na compreensão do problema de partida e na definição e avaliação das estratégias possíveis para a sua resolução, podendo assim contribuir para a criação de situações de aprendizagem significativa (Almeida, 2001).

Tendo em conta este contexto, o objectivo do trabalho desta tese foi desenvolver actividades experimentais passíveis de serem realizadas nas escolas e facilmente apreendidas pelos alunos. As actividades práticas propostas podem-se inserir nos conteúdos programáticos das disciplinas de Ciências Naturais do 9º ano, Biologia/Geologia do 10º ano e Biologia do 12º ano conforme exposto no quadro 1.





**Quadro 1 - Inserção das actividades práticas nos conteúdos programáticos**

<b>Actividades práticas</b>	<b>Unidade temática / Conteúdo</b>	<b>Ano de escolaridade</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Tempo previsto</b>
I – Estudo do estado de oxidação-redução dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de electrões	U 3 – Transformação e utilização de energia pelos seres vivos 1. Obtenção de energia; respiração aeróbia	10º	TP + P	45'+90'+45'
	Área de Projecto: projecto transversal com a disciplina de Físico-Química	12º	TP + P	90'+90'+45'
II – Factores que afectam a actividade enzimática da catalase	Tema 4: Viver melhor na Terra U 3 – Organismo humano em equilíbrio	9º	TP + P	45'+90'+45'
	U 3 – Transformação e utilização de energia pelos seres vivos 1. Obtenção de energia; respiração aeróbia	10º	TP + P	45'+90'+45'
III – Determinação da actividade da catalase e estudo da cinética enzimática	U 4 – Produção de alimentos e sustentabilidade 1.1. Fermentação e actividade enzimática	12º	TP + P	45'+90'+45'
	Área de Projecto: projecto transversal com a disciplina de Físico-Química	12º	TP + P	90'+90'+45'

A actividade I, intitulada *Estudo do estado de oxidação-redução dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de electrões*, insere-se no programa de Biologia/Geologia-I (10º ou 11ª anos) na Unidade 3 – Transformação e utilização de energia pelos seres vivos. Pretende-se que esta actividade ajude a consolidar os conteúdos referentes à respiração celular, permitindo ainda a exploração da importância das mitocôndrias no envelhecimento e morte celular. Embora ultrapasse o âmbito do programa nacional poderá ser sempre utilizado como um instrumento de aplicação dos conteúdos apreendidos e de relacionamento com o bem-estar dos indivíduos. Também esta actividade pode ser utilizada no 12º ano na disciplina de Área Projecto pelos motivos já atrás descritos. Os objectivos para a actividade seriam os mesmos que para a disciplina de Biologia/Geologia-I podendo, no entanto, ser feita uma maior exploração dos conceitos.

No 9º ano um tema curricular proposto é **Viver Melhor na Terra** tendo como objectivo “*a compreensão de que a qualidade de vida implica saúde e segurança...*”(in Orientações Curriculares para o 3º ciclo do Ensino Básico). A actividade II, designada *Factores que afectam a actividade enzimática da catalase*, enquadra-se na unidade 3 deste tema: U3 - Organismo humano em equilíbrio. Pode ser explorada para fazer, por um lado, a integração dos diferentes sistemas fisiológicos estudados (sistemas cardio-respiratório, digestivo e excretor), servindo para interligar e rever os conteúdos e, por outro, avaliar o nível de compreensão e aplicação que os alunos conseguiram relativamente aos conteúdos leccionados. A actividade II também pode ser abordada na disciplina de Biologia/Geologia-I (10 ou 11º anos) no início da Unidade 3 de Biologia - Transformação e utilização de energia pelos seres vivos permitindo alguma transversalidade com a unidade anterior (Unidade 2 - Distribuição de matéria) e recordar alguns conceitos sobre a natureza das enzimas e o seu papel funcional nos organismos vivos.

A actividade III, denominada *Determinação da actividade da catalase e estudo da cinética enzimática*, insere-se no programa de Biologia de 12º ano na Unidade 5 – Produção de Alimentos e Sustentabilidade. Pretende-se que os alunos reconheçam a importância biológica das enzimas sendo de enfatizar os seguintes aspectos (in Programa de Biologia 12º ano):

-  As enzimas como biocatalisadores indispensáveis ao metabolismo celular.
-  Factores que afectam a actividade enzimática.
-  Especificidade enzima-substrato.
-  Conceito de via metabólica.

A escolha da catalase para realização do estudo da sua cinética baseia-se no facto dela desempenhar um papel muito importante no nosso organismo mas que não é muito realçado no currículo nacional. Permite alguma transversalidade com a Unidade 2: Património genético (Efeito oncogénico de radiações e substâncias químicas) e com a Unidade 3: Imunidade e controlo de doenças (Conhecimento de processos que asseguram mecanismos de defesa do organismo). Para além disso o procedimento experimental proposto não é dispendioso e é de fácil apreensão e realização pelos alunos deste grau de ensino. O estudo da cinética desta enzima vai permitir que os alunos compreendam a relevância deste tipo de estudos para a biotecnologia enzimática. Para além da aula de Biologia, esta actividade poderia ainda ser explorada na área curricular designada por Área Projecto. Esta disciplina é uma área curricular que “visa a mobilização e a integração de competências adquiridas nas diferentes disciplinas ao longo do percurso do secundário, desenvolvendo e aprofundando competências de trabalho autónomo e em equipa no âmbito da elaboração de trabalhos, de iniciação à investigação, na aplicação de conhecimentos adquiridos nas disciplinas do currículo, na utilização de ferramentas simples de tratamento de dados, na análise e interpretação qualitativa e quantitativa da informação e de monitorização de fenómenos” (*in* Documento Orientador da Revisão Curricular do Ensino Secundário). Neste âmbito pode haver um trabalho integrado entre as disciplinas de Biologia e Físico-Química / Química (relativamente à preparação das soluções, do processo de titulação, compreensão das reacções e cálculos envolvidos).

Este trabalho integra duas partes distintas. Numa primeira parte (Parte I – Componente Científica) pretendeu-se fazer uma abordagem sobre a influência que o Oxigénio teve e tem sobre os seres vivos. Inclui uma revisão bibliográfica sobre o metabolismo oxidativo e consequências positivas e negativas deste, descrição dos protocolos a implementar, apresentação dos resultados obtidos e sua discussão. A compreensão de que o oxigénio é essencial, mas também pode actuar como um veneno, permitirá uma nova abordagem da energética celular e suas implicações. Por outro lado, o reconhecimento do papel essencial das enzimas, em geral e da catalase, em particular, no metabolismo dos seres vivos e nos mecanismos de defesa antioxidante torna relevante o seu estudo.

Na segunda parte (Parte II - Componente Pedagógica) são apresentados os protocolos otimizados, a respectiva inserção curricular e propostas de abordagem dos

mesmos. Esta componente da dissertação pode funcionar como um destacável. As propostas de abordagem apresentadas poderão servir como guiões de exploração dos protocolos, podendo ser utilizados por professores para a exploração de cada actividade. Cada protocolo está optimizado de modo a poder ser usado nas aulas quer por professores quer por alunos que pretendam desenvolver um projecto de investigação nas temáticas do “Metabolismo oxidativo” e/ou da “Biotecnologia enzimática”.

## **PARTE I: COMPONENTE CIENTÍFICA**



## **INTRODUÇÃO**





## O oxigénio no mundo vivo:

O oxigénio é um elemento químico que existe no ar como uma molécula diatómica -  $O_2$ . À excepção de certos organismos unicelulares anaeróbios e aerotolerantes (certas bactérias e leveduras) todos os outros requerem oxigénio para uma eficiente produção de energia através do uso de uma cadeia de transporte de electrões associada ao oxigénio, localizada nas mitocôndrias das células eucarióticas. Esta necessidade de oxigénio mascara muitas vezes o facto do oxigénio ser um gás tóxico mutagénico assim como altamente inflamável; os aeróbios, apesar de não sobreviverem sem ele, tiveram que desenvolver defesas antioxidantes para se protegerem (*in Halliwell et al*, 1999).

O oxigénio apareceu na atmosfera terrestre, em quantidades significativas, há cerca de 2.5 GA e evidências geológicas indicam que isto terá ocorrido devido à evolução da fotossíntese pelas algas azuis (cianobactérias). Conforme usaram a água para obter o hidrogénio necessário para as reduções metabólicas, estas bactérias libertaram toneladas de oxigénio para a atmosfera. O aumento na concentração do oxigénio atmosférico foi de um certo modo vantajoso, uma vez que permitiu a formação da camada de ozono ( $O_3$ ) na estratosfera. A capacidade do  $O_3$  e  $O_2$  para filtrar muitas das radiações solares UV intensas permitiu que os organismos, por um lado saíssem dos mares e colonizassem a terra mas, por outro, o aumento do teor de  $O_2$  também submeteu os seres vivos, então existentes, a condições de stresse muito intensas (*in Halliwell et al*, 1999).

Quando os seres vivos apareceram na Terra, eles viviam numa atmosfera contendo pouco oxigénio, isto é, eram essencialmente anaeróbios. Microrganismos anaeróbios conseguiram sobreviver até à actualidade, mas o seu crescimento é inibido e podem mesmo morrer se expostos a percentagens de 21% de  $O_2$ , o valor actual deste gás na atmosfera. À medida que o teor de oxigénio na atmosfera aumentava, muitos organismos primitivos devem ter morrido. Os anaeróbios actuais são, presumivelmente, descendentes desses organismos primitivos que seguiram o percurso evolutivo de adaptação ao aumento do nível de  $O_2$  atmosférico através da restrição aos ambientes onde o  $O_2$  não podia penetrar. Contudo, outros organismos iniciaram o processo evolutivo desenvolvendo sistemas de defesa antioxidantes para se protegerem contra a toxicidade do oxigénio (esta foi a via mais vantajosa). Os organismos que toleraram a presença de  $O_2$  puderam evoluir no sentido de o usarem nas suas transformações

metabólicas catalizadas por oxidases, oxigenases e hidrolases tais como a tirosina hidroxilase ou o citocromo P450, e para produção eficiente de energia desenvolvendo cadeias de transporte de electrões com o oxigénio como aceitador final, tal como ocorre actualmente na mitocôndria. As mitocôndrias produzem cerca de 80% do ATP necessário pelas células dos mamíferos, e substâncias que inibam este transporte, como o cianeto, são letais o que demonstra a sua importância (*in Halliwell et al*, 1999).

Hoje, o oxigénio é o elemento mais prevalecente na crusta terrestre chegando a percentagem de O<sub>2</sub> na atmosfera a cerca de 21%. A pressão barométrica do ar seco ao nível do mar é de 760mmHg, o que corresponde a uma pressão parcial de oxigénio de 159mmHg. Os níveis de oxigénio podem, no entanto, ter sido mais elevados em períodos anteriores da história da Terra. Pensa-se que a partir do Devónico médio-superior, o teor de O<sub>2</sub> aumentou de 18 a 20%, para valores próximos dos 35% no Carbonífero superior; uma vez que o grande desenvolvimento das plantas terrestres fez aumentar a quantidade de O<sub>2</sub> e diminuir drasticamente o teor de CO<sub>2</sub> (*in Berner*, 1999). Este aumento do teor de O<sub>2</sub> permitiu que os insectos (onde o sistema de distribuição do O<sub>2</sub> depende essencialmente da difusão directa) fossem maiores. Por exemplo, a libelinha gigante do Carbonífero *Meganeura monyi* tem um diâmetro torácico de 2,8cm (comparando com um máximo de 1cm nas libelinhas actuais). A maioria dos insectos que atingiram tamanhos corporais excepcionais no Carbonífero não persistiram depois do Pérmico, quando as concentrações de O<sub>2</sub> voltaram a diminuir. As plantas e animais que existiram durante o Carbonífero presumivelmente desenvolveram defesas antioxidantes eficientes, que seria interessante estudar hoje se fosse possível ressuscitar algumas dessas formas (*in Halliwell et al*, 1999).

O oxigénio é também encontrado nos mares, rios e outros meios aquáticos. A solubilidade do O<sub>2</sub> na água do mar, exposta ao ar seco a 10°C, corresponde a uma concentração de 0.284 mmol/l, e diminui para temperaturas superiores (por exemplo, 0.21mmol/l) sendo, no entanto, maior na água doce (para a água destilada é: 0,258 mmol/l a 25°C, 0.355 mmol/l a 10°C). Mas a concentração de O<sub>2</sub> que chega às células vivas nos organismos multicelulares dependerá da distância que o O<sub>2</sub> tem que percorrer até ao local onde é consumido, assim como, da rapidez com que é consumido. Como a respiração celular não necessita de elevadas concentrações de oxigénio para poder decorrer, a diminuição gradual da concentração de O<sub>2</sub> à qual as células no interior do corpo estão expostas permite diminuir a toxicidade por O<sub>2</sub> (por exemplo, a tensão de O<sub>2</sub> no sangue venoso humano é somente de 40 mmHg, cerca de 53μmol/l O<sub>2</sub>). Também no

interior da maioria das células eucarióticas, há um gradiente de  $O_2$ , diminuindo a sua concentração da membrana celular até às mitocôndrias. Em condições fisiológicas, o  $O_2$  é 5 a 8 vezes mais solúvel em solventes orgânicos que na água, um dado a ter em conta considerando o dano oxidativo que pode ocorrer no interior hidrofóbico das membranas biológicas (*in Halliwell et al*, 1999).

### **...dos melhoramentos extraordinários...**

O modo como os seres vivos obtêm energia evoluiu de uma forma eficiente permitindo o desenvolvimento de organismos multicelulares complexos, que também precisaram de desenvolver sistemas que assegurassem a distribuição de  $O_2$  por todo o organismo. Uma vantagem do desenvolvimento destes sistemas é que a distribuição de oxigénio às células pode ser controlada: por exemplo, a maioria das células do corpo humano nunca foram expostas à pressão atmosférica real. Há mecanismos que fazem a monitorização dos níveis de  $O_2$  no corpo e alteram a taxa respiratória e o fluxo sanguíneo de forma a controlar tais níveis de oxigénio (*in Halliwell et al*, 1999).

Os organismos multicelulares complexos tais como os mamíferos desenvolveram mecanismos de forma a assegurar que o  $O_2$  é enviado para todas as células que necessitam dele. Algum  $O_2$  segue dissolvido no plasma sanguíneo, mas a solubilidade do  $O_2$  na água, à temperatura do corpo, é limitada. A maior parte do  $O_2$  é transportada no sangue pela hemoglobina. A molécula de hemoglobina tem quatro sub-unidades proteicas, organizadas em duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , cada uma com um grupo hema com ferro no estado  $Fe^{2+}$ . O oxigénio reage reversivelmente com o grupo hema, ligando-se quando o sangue passa pelos pulmões onde as concentrações de  $O_2$  são altas e dissociando-se outra vez quando o nível de oxigénio é baixo nos tecidos. A hemoglobina dos eritrócitos conduz o  $O_2$  até às células doutros tecidos, permitindo a acção de enzimas que catalizam transformações metabólicas dependentes do  $O_2$  com uma produção eficiente de energia (*in Halliwell et al*, 1999).

Na presença de oxigénio, as células podem obter muita mais energia a partir de um mesmo substrato orgânico (a glicose, por exemplo). Nos seres vivos eucarióticos estas reacções ocorrem na mitocôndria associando o transporte dos electrões provenientes dos compostos orgânicos, ao longo de uma cadeia transportadora, até ao

oxigénio (aceitador final dos electrões) com a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. Este processo conjunto constitui a fosforilação oxidativa.

### ***A Mitocôndria: evolução***

É actualmente aceite que a mitocôndria representa um fragmento de um organismo procariótico que se tornou simbiote com outra célula numa fase precoce da evolução da vida na Terra. A teoria endossimbiótica postula que uma célula proteo-eucariótica capturou uma proteo-bactéria por endocitose; com o tempo foi-se desenvolvendo uma relação simbiótica acompanhada de perda de genes redundantes e a transferência de genes da célula procariótica para o núcleo eucariótico. Na verdade a mitocôndria não consegue ser autónoma e é totalmente dependente do ser hospedeiro. Uma outra visão revisionista da evolução dos eucariontes propõe que não existiram eucariontes amitocôndriais mas a fusão de archeobactérias anaeróbias (o hospedeiro) com proteobactérias que respiravam (o simbiote) representam o “big-bang” da formação dos eucariontes. Há provas que os eucariontes actuais amitocôndriados (*Archeozoa*, *Giardia*) resultaram também deste evento inicial, mas perderam as suas mitocôndrias no decorrer do tempo (Roger *et al*, 1998). Todas as evidências apontam para uma origem monofilética da mitocôndria defendendo que a endossimbiose ocorreu uma única vez na evolução da vida. Da análise de sequências de nucleótidos de genes específicos (por exemplo, de genes ribossomais) podem ser deduzidas as relações filogenéticas que vêm em apoio a esta hipótese sobre a origem das mitocôndrias (*in* Scheffler, 2001).

Numa escala de tempo mais restrita, cobrindo a evolução dos mamíferos, os genomas mitocôndriais têm permanecido muito estáveis no que diz respeito ao conteúdo de genes e até à sua organização no DNA circular. Contudo, há uma divergência significativa na sequência de genes individuais e daí nas sequências de aminoácidos das proteínas codificadas. Uma vez que estas proteínas são subunidades de complexos maiores na membrana mitocondrial interna, elas têm de interagir com proteínas codificadas pelo genoma nuclear, e estes dois grupos de proteínas têm de permanecer compatíveis. Daí resulta que mitocôndrias de uma espécie não podem continuar funcionais em combinação com o núcleo de outra espécie, por exemplo, na formação de células somáticas híbridas (Barrientos *et al*, 1998). Estas considerações ganham uma importância prática no contexto da pesquisa em células estaminais e na publicitada clonagem de animais. Tem havido dificuldades na transferência de núcleos de células

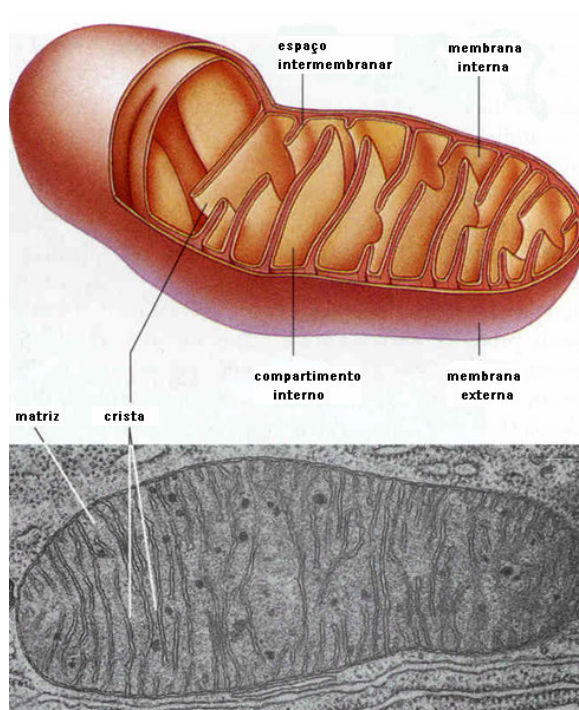
somáticas de muitas espécies de mamíferos para oócitos bovinos anucleados. Uma razão para a falha no desenvolvimento desses embriões pode dever-se à incompatibilidade entre o genoma nuclear dos mamíferos utilizados e aproximadamente 100.000 moléculas de mtDNA de um oócito de bovino (Scheffler, 2001).

### ***A Mitocôndria: estrutura***

A mitocôndria é um organelo que existe em todas as células eucaróticas apresentando duas membranas unitárias. As mitocôndrias têm uma forma variável, desde a esférica à muito alongada; as mitocôndrias do fígado são geralmente alongadas medindo 1,5  $\mu$ m no eixo maior e 0,5  $\mu$ m no eixo menor (Tribe, 1972).

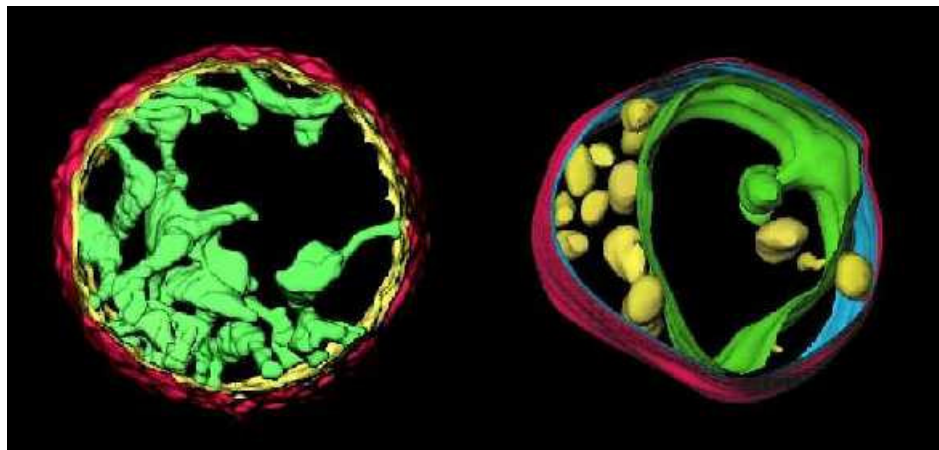
Inicialmente foram propostos dois modelos que descreviam a estrutura da membrana mitocondrial interna baseados em imagens de microscopia electrónica de transmissão bidimensional. Palade

em 1952 designou as projecções da membrana mitocondrial interna (MMI) por cristas mitocondriais, e descreveu-as como projecções do tipo “tipo compartimento” (baffle-type) que resultavam de grandes pregas da MMI (figura 1). Este foi o modelo mais popular da estrutura mitocondrial e assumia a continuidade entre os espaços internos das cristas e o espaço intermembranar. O segundo modelo proposto por Sjostrand em 1956 sugere que a MMI forma septos que dividem a matriz em vários compartimentos. Usando uma técnica de microscopia electrónica por tomografia com mitocôndrias de fígado de rato, Mannella *et al* (1994) mostraram que os dois modelos da estrutura mitocondrial (o de Palade e o de Sjostrand) eram incorrectos; as cristas não eram projecções da MMI mas sim estruturas pleomórficas que variam em tamanho, forma, complexidade e densidade. Muitas das cristas observadas eram extensões tubulares da



**Figura 1 - Modelo mitocondrial de Palade e fotografia ao M.E. Retirada de [1]**

MMI com diâmetros variando entre 30 e 50 nm, e que se estendem centenas de nanômetros pelo espaço da matriz. Descobriram também que as junções crista-MMI têm aproximadamente 28 nm de diâmetro, refutando a ideia de que as cristas são contínuas com o espaço intermembranar [2]. As figuras 2 e 3 mostram imagens tridimensionais de mitocôndrias obtidas ao ME de tomografia.



**Figura 2 - Modelo 3D obtido por ME de tomografia de uma mitocôndria normal de fígado de rato (esquerda) e de uma mitocôndria de músculo de um doente com patologia mitocondrial (direita).** Retirada de [3]



**Figura 3 - Imagem de uma mitocôndria isolada mostrando a natureza tubular das cristas.** Retirada de [3]

Este tipo de imagens veio mostrar que as cristas estão ligadas à MMI através de poros de contacto limitados e não são simples invaginações da MMI. Deste modo é possível encontrar seis compartimentos discretos na mitocôndria: a membrana mitocondrial externa (MME), membrana mitocondrial interna (MMI), membrana das cristas, espaço intracristas, espaço intermembranar e matriz. A maioria das proteínas está localizada num ou dois destes compartimentos. A MME tem um perfil proteico distinto do da MMI e membrana das cristas [4]. A membrana mitocondrial externa é praticamente lisa e permeável a todas as pequenas moléculas e iões, aos quais se movem livremente através de canais transmembranares. É constituída por 50% lípidos e 50% proteínas (Tribe, 1972; Devlin *et al*, 1997; Nelson *et al*, 2005). A membrana mitocondrial interna (MMI) é impermeável à maioria de pequenas moléculas e iões, incluindo protões ( $H^+$ ); as únicas espécies que atravessam a MMI conseguem-no à custa de transportadores específicos. A MMI é constituída essencialmente por proteínas (80%) e contém a maioria das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, várias desidrogenases e vários sistemas de transporte envolvidos na transferência de substratos, intermediários metabólicos e nucleotídeos de adenina entre o citosol e a matriz mitocondrial (Devlin *et al*, 1997; [4]) Há evidências de que os complexos da cadeia respiratória existem independentemente e interactuam por difusão, no entanto, outros estudos são a favor de uma organização supramolecular destes complexos [4].

Em geral, o número de mitocôndrias e a complexidade da sua estrutura interna varia com as necessidades energéticas da célula. Em células relativamente inactivas, as mitocôndrias são poucas e têm uma estrutura interna simples. Por outro lado, células envolvidas no transporte activo, na síntese de lípidos a partir de hidratos de carbono, ou na conversão da energia química em trabalho mecânico, contêm normalmente um grande número de mitocôndrias com um grande número de cristas. Pode supor-se uma correlação entre a complexidade da estrutura interna da mitocôndria e a sua capacidade oxidativa. Também é verdade que deficiências na actividade metabólica podem ser acompanhadas por alterações visíveis na estrutura da mitocôndria (figura 2) (Tribe, 1972; [5]). A distribuição de mitocôndrias pela célula é um processo dinâmico que envolve várias estruturas do citoesqueleto (filamentos de actina, microtubulos) e diversas “proteínas motor” tais como miosinas, dineínas e cinesinas (Scheffler, 2001).

Em conjunto com os cloroplastos, as mitocôndrias são os únicos organelos subcelulares com o seu próprio genoma. Embora a maioria das cerca de 1000 proteínas



mitocôndriais sejam codificadas por genes nucleares, 13 proteínas são codificadas pelo mtDNA circular nos mamíferos e são essenciais para a respiração e fosforilação oxidativa. As 13 proteínas codificadas pelo mtDNA animal incluem 7 subunidades para a NADH-ubiquinona redutase (complexo I), 1 subunidade para o complexo III, 3 subunidades da citocromo oxidase (complexo IV) e 2 subunidades para a ATP sintetase (complexo V). Todas são proteínas membranares integrais embebidas na MMI em associação com outras subunidades destes complexos de transporte de electrões. Deste modo, mecanismos de replicação e reparação do DNA, transcrição e síntese proteica na matriz, terão que decorrer na mitocôndria (Scheffler, 2001).

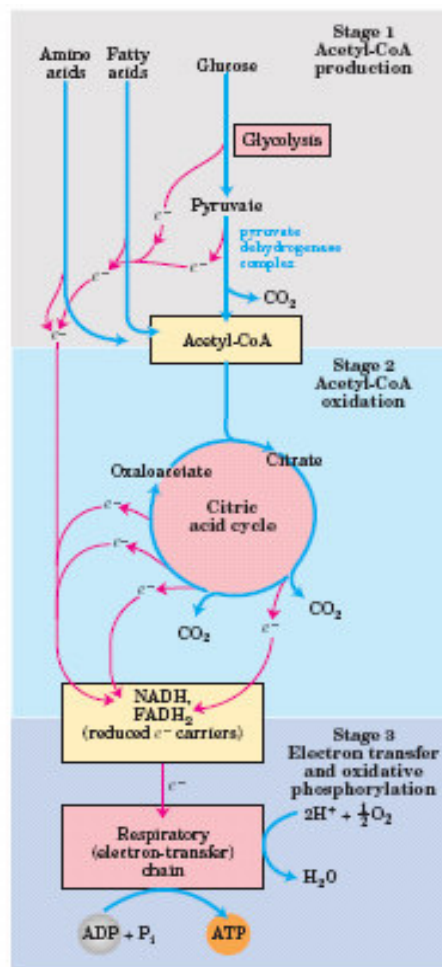
### ***A Mitocôndria e o metabolismo energético***

O metabolismo consiste num conjunto de reacções químicas integradas através das quais os seres vivos obtêm energia e constituintes celulares (biomoléculas). Embora os seres vivos sejam morfológica e fisiologicamente diferentes, ao nível celular essas diferenças atenuam-se. O metabolismo energético nos diferentes seres vivos apresenta sequências semelhantes com muitos pontos em comum. Estes incluem a utilização da mesma forma de energia disponível, o ATP, e o aparecimento repetido de um conjunto de cerca de 100 moléculas que desempenham um papel principal em todas as formas de vida. Contudo, embora o número de reacções no metabolismo seja grande, o número do tipo de reacções é pequeno e o mecanismo destas reacções é bastante simples, incluindo o de regulação das vias metabólicas que também se processa de forma comum (Berg *et al*, 2002)

A produção de energia metabólica é feita a partir da oxidação dos nutrientes alimentares: estes perdem electrões, os quais são aceites por transportadores de electrões, tais como a adenina nicotinamida dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) e flavinas (flavina mononucleótido (FMN) e flavina adenina dinucleótido (FAD)). A adenina nicotinamida dinucleótido e flavinas reduzidas ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FMNH}_2$  e  $\text{FADH}_2$ ) resultantes são reoxidados pelo oxigénio na mitocôndria, produzindo grandes quantidades de ATP. A oxidação é catalizada numa sequência de passos de modo que a energia é libertada gradualmente. Isto é conseguido através da cadeia de transporte de electrões existente na membrana mitocondrial interna. Os electrões passam do NADH para proteína férricas não hema. Estas aceitam os electrões convertendo a sua ligação ferro do  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  cedendo depois os electrões através de uma reoxidação a  $\text{Fe}^{3+}$ . Mais à frente, na cadeia, as proteínas dos citocromos, com iões ferro ligados a grupos hema, actuam da

mesma forma (*in Halliwell, 1999*). Parte da energia livre resultante da oxidação dos alimentos e a da luz é transformada em ATP que actua como um dador de energia livre nos processos que requerem energia tais como movimento, transporte activo ou biossíntese.

Krebs descreveu três fases na formação de energia a partir da oxidação dos alimentos (figura 4). Na *primeira fase*, grandes moléculas de alimentos são quebradas em unidades mais pequenas. Esta fase é estritamente uma fase preparatória não havendo formação de energia útil (digestão). Na *segunda fase*, um grande número de pequenas moléculas vai ser degradado num pequeno número de unidades mais simples que desempenham um papel central no metabolismo (num processo designado de *glicólise* seguido da redução do piruvato a acetilCoA). Algum ATP é gerado nesta fase mas a quantidade é pequena comparada com a terceira fase. Na *terceira fase* o ATP é produzido através da oxidação completa da unidade de acetilCoA. Esta fase consiste no *ciclo do ácido cítrico* e na *fosforilação oxidativa* a qual é a via formal comum na oxidação de moléculas combustíveis. A acetilCoA introduz uma unidade acetil no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) onde é completamente oxidada em CO<sub>2</sub>. Quatro pares de electrões são transferidos (três para o NADH e um para o FADH<sub>2</sub>) por cada grupo acetil oxidado gerando-se um gradiente de electrões à medida que os electrões fluem destes transportadores reduzidos para o oxigénio que é usado para sintetizar ATP (Berg *et al*, 2002).



**Figura 4 - Sequência de estádios desde a glicólise até à cadeia transportadora de electrões e fosforilação oxidativa.** Retirado de Nelson *et al*, 2005.

A glicólise é uma via metabólica antiga utilizada por uma grande quantidade de organismos, procarióticos ou eucarióticos, ocorrendo no citosol das células. Consiste numa sequência de reacções que metabolizam uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato com uma produção líquida de duas moléculas de ATP. Este processo é anaeróbio (não requer oxigénio) pelo que terá evoluído antes da acumulação de quantidades substanciais de oxigénio na atmosfera (Berg *et al*, 2002).

A conversão de glicose em duas moléculas de piruvato tem como consequência a síntese líquida de duas moléculas de ATP. Contudo, uma via que pare no piruvato não pode estar activa por muito tempo porque o equilíbrio redox não é mantido. A actividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enzima desta via metabólica, necessita de  $\text{NAD}^+$ . No entanto, quantidade de  $\text{NAD}^+$  na célula é limitada pelo que esta molécula deve ser regenerada para a glicólise prosseguir. O objectivo final desta via é a regeneração do  $\text{NAD}^+$  através do metabolismo do piruvato. A regeneração do  $\text{NAD}^+$  através da redução do piruvato a lactato ou etanol sustém a continuidade da glicólise em condições anaeróbias (Berg *et al*, 2002).

A sequência de reacções, da glicose até ao piruvato, é semelhante em muitos organismos e células. Pelo contrário, o destino do piruvato é muito variável. Três reacções são de principal importância: conversão em etanol, em ácido láctico ou em  $\text{CO}_2$ .

A conversão em etanol ocorre em leveduras e muitos outros organismos e consiste numa descarboxilação do piruvato a acetaldeído e posterior redução a etanol pelo NADH; a conversão da glicose até etanol é um exemplo de fermentação alcoólica.



A conversão em lactato ocorre numa variedade de microrganismos, num processo designado por fermentação láctica, podendo também realizar-se nas células de seres superiores quando a quantidade de oxigénio é limitante; a redução do piruvato pelo NADH para formar lactato é catalisada pela lactato desidrogenase.



A oxidação aeróbia da glicose até  $\text{CO}_2$  permite extrair muita mais energia via ciclo de Krebs e cadeia transportadora de electrões. O ponto de entrada na via oxidativa

é a acetilCoA que se forma na mitocôndria por descarboxilação oxidativa do piruvato. A CoA serve como transportador de grupos acil activados, dos quais o grupo acetil é dos mais simples, entrando no ciclo de Krebs. Este combina reacções de ruptura com oxidações, originando CO<sub>2</sub> e regenerando o oxaloacetato, ao mesmo tempo que captura a energia metabólica libertada sob a forma de NADH e ATP.

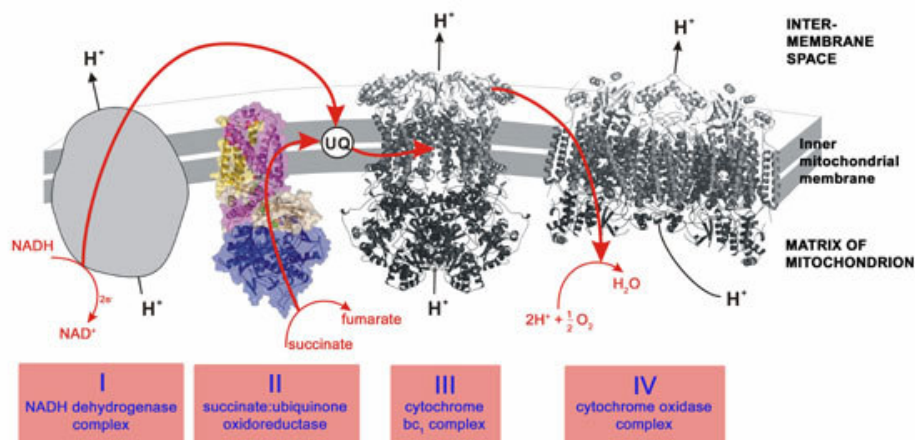
### ***Transporte de electrões e fosforilação oxidativa***

Em 1948 Eugene Kennedy e Albert Lehninger descobriram que a mitocôndria era o local onde ocorria a fosforilação oxidativa (Nelson *et al*, 2005).

Os electrões armazenados na forma de coenzimas reduzidas, NADH ou FADH<sub>2</sub>, passam por uma cadeia de proteínas e coenzimas muito elaborada e altamente organizada, chamada cadeia de transporte de electrões (CTE), chegando finalmente ao oxigénio molecular (O<sub>2</sub>), o aceitador final de electrões. Cada componente desta cadeia pode existir em (pelo menos) dois estados oxidativos, e cada componente é sucessivamente reduzido e reoxidado conforme os electrões se deslocam do NADH ou FADH<sub>2</sub> para o O<sub>2</sub>. No decurso do transporte de electrões, a energia libertada é armazenada sob a forma de um gradiente de protões através da membrana mitocondrial interna. É do gradiente de protões que provêm a energia para a síntese do ATP (Garrett *et al*, 1995).

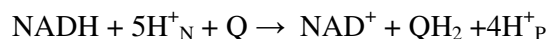
A hipótese quimiosmótica de Mitchell, proposta em 1961, foi revolucionária no campo da bioenergética devido a separar fisicamente o processo de transporte de electrões e de respiração da estrutura enzimática responsável pela síntese do ATP. Os complexos I, III e IV da CTE associam o transporte de electrões com o bombeamento de protões que permite o estabelecimento de um gradiente de H<sup>+</sup> que posteriormente é usado para a síntese do ATP pelo complexo V. Os princípios básicos são aplicáveis à fosforilação oxidativa na mitocôndria, fotossíntese e reacções associadas nos cloroplastos e organismos procariontes capazes de usar a luz para produzir ATP (Scheffler, 2001).

Os transportadores de electrões da cadeia respiratória estão organizados em complexos supramoleculares embebidos na membrana (figura 5). Actualmente, a determinação da estrutura cristalina dos complexos tem valor não só para compreender o fluxo de electrões e a sua associação com o bombeamento de H<sup>+</sup>, mas também para uma maior compreensão dos locais de ligação de diferentes inibidores. É a estrutura destes complexos que se descreve de seguida.

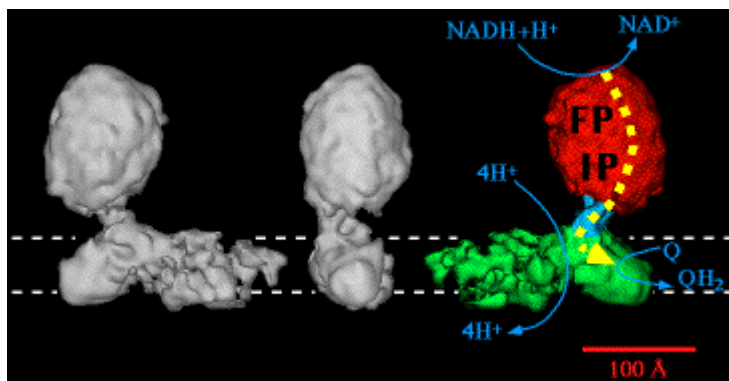


**Figura 5 - Sequência do transporte de electrões através da cadeia transportadora de electrões até ao oxigénio.** Retirado de [6]

*Complexo I: NADH: ubiquinona oxidoreductase ou NADH desidrogenase.* É um complexo enzimático composto por 42 cadeias polipeptídicas diferentes, incluindo uma flavoproteína (FMN) e cerca de 7 centros Fe-S. Imagens ao microscópio electrónico de alta resolução mostram que o complexo I tem uma forma em L com um braço embebido na MMI e o outro estendido para a matriz (figura 6). Este complexo catalisa dois processos simultâneos: a transferência para a ubiquinona de um ião hídrido do NADH e de um protão da matriz, e a transferência endergónica de 4 protões da matriz para o espaço intermembranar. O complexo I é, pois, uma bomba de protões conduzida pela energia de transferência de electrões, sendo uma reacção vectorial: os protões deslocam-se numa direcção específica a partir da matriz (que passa a ficar com carga negativa - lado negativo da MMI <sub>N</sub>) para o espaço intermembranar (que fica carregado positivamente - lado positivo da MMI <sub>P</sub>); a reacção pode ser escrita da seguinte forma:



O complexo I catalisa a transferência do ião hídrido do NADH para o FMN, com transferência de 2 electrões através de uma série de centros Fe-S para a ubiquinona formando QH<sub>2</sub>, que se difunde no interior da camada fosfolipídica da MMI [7].

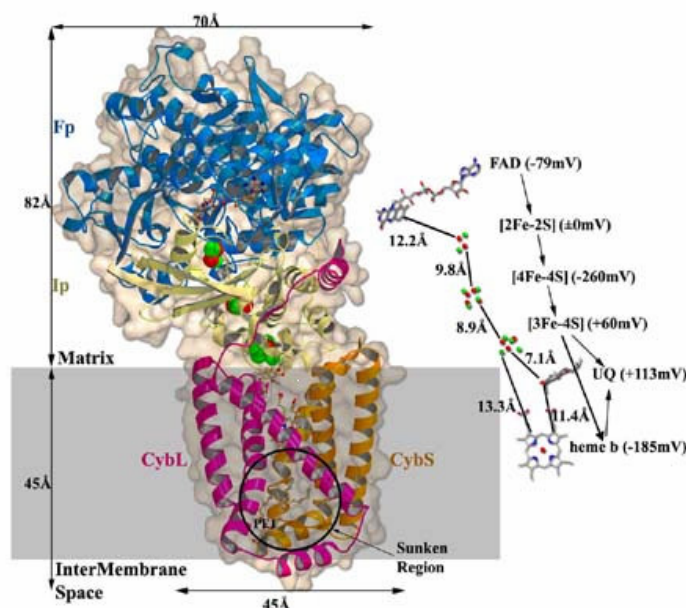


**Figura 6 - Complexo I (bovino) inserido na MMI (linhas a tracejado) da mitocôndria com uma resolução de 17Å.** A estrutura deste complexo de multisubunidades com 900 000 Dalton foi calculado a partir de 6000 imagens de partículas simples embebidas em gelo. Estas imagens revelam, pela primeira vez um fino pedúnculo (azul) ligando o braço estendido para a matriz (vermelho) com o lado embebido na membrana (verde). Para mais detalhes: Grigorieff, N. (1998). J. Mol. Biol., 277, 1033-1046. Retirado de [7]

A propriedade redox única da flavina do FMN é importante uma vez que o NADH é um dador de 2 electrões enquanto que as proteínas Fe-S só transportam 1 electrão ( $\text{Fe}^{3+}$  oxidado/ $\text{Fe}^{2+}$  reduzido). A flavina do FMN tem 3 estados redox - oxidado, semireduzido e reduzido - podendo actuar como aceitador de 1 ou 2 electrões e serve de ligação crítica entre o NADH e as proteínas Fe-S (Garrett *et al*, 1994). Esta transferência de electrões provoca a passagem de 4  $\text{H}^+$  da matriz para o espaço intermembranar por cada par de electrões. A rotenona (derivado de uma planta e comumente usado como insecticida) inibe o fluxo de electrões dos centros Fe-S do complexo I para a coenzima Q bloqueando todo o processo de fosforilação oxidativa. Também a coenzima Q pode existir em três estados redox: oxidado (Q), semireduzido ( $\text{Q}^-$ ) e reduzido ( $\text{QH}_2$ ) permitindo-lhe aceitar/doar 1 ou 2 electrões (Nelson *et al*, 2005).

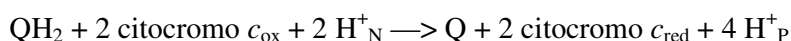
*Complexo II: succinato:ubiquinone oxidoreductase.* É a única enzima do Ciclo do Ácido Cítrico que se encontra inserida na membrana. Este complexo é constituído por 4 subunidades proteicas diferentes: uma flavoproteína (622 aminoácidos), uma proteína Fe-S (252 aminoácidos), e duas proteínas de ligação à membrana (CybL, 140 aminoácidos e CybS, 103 aminoácidos) com um total de 6 hélices transmembranares (figura 7). A estrutura do complexo II também inclui grupos prostéticos necessários à transferência dos electrões do succinato para a ubiquinona. Quando ocorre redução do FAD a  $\text{FADH}_2$  neste complexo eles são transferidos para os centros Fe-S que os transferem para a ubiquinona. A pequena quantidade de energia livre que se liberta

nesta reacção não é suficiente para o transporte de prótons através da membrana. Este é um aspecto crucial, uma vez que o transporte de  $H^+$  está associado à síntese de ATP. A oxidação de um  $FADH_2$  na CTE resulta na síntese aproximada de dois ATP em comparação com os três ATP produzidos pela oxidação de um NADH (Garrett *et al*, 1995).

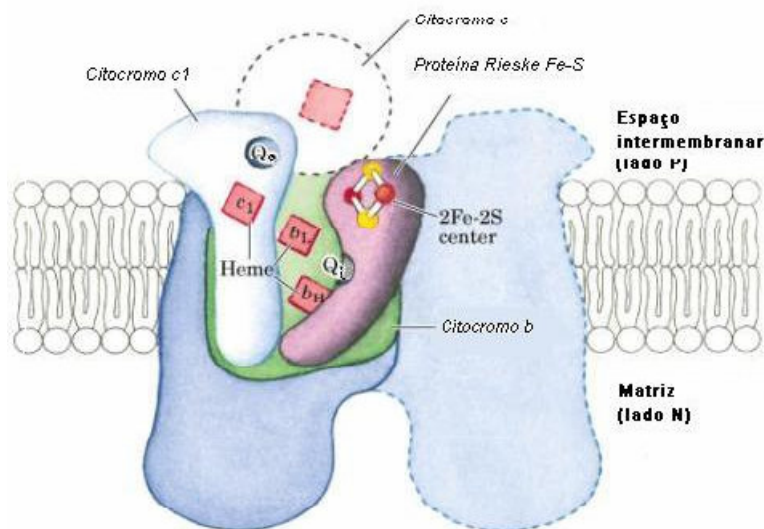


**Figura 7 - Estrutura do complexo II da cadeia respiratória (à esquerda).** A flavoproteína (FAD) é mostrada a azul; a proteína Fe-S (Ip) é mostrada a bege; as proteínas transmembranares CybL e CybS são mostradas a rosa e dourado, respectivamente. **Grupos prostéticos que constituem a via de transferência de electrões (à direita).** FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] e heme *b* estão representados juntamente com a UQ, com indicação das respectivas distâncias e potências redox standard. Retirado de [6]

*Complexo III: Coenzima Q - citocromo c redutase.* No terceiro complexo da CTE, a coenzima Q reduzida ( $QH_2$ ) passa os seus electrões para o citocromo *c*, um transportador hidrossolúvel que se desloca no espaço intermembranar (figura 8). Este complexo envolve três citocromos diferentes com grupos prostéticos hema (Cit. *c*<sub>1</sub>, Cit. *b* e Cit. *c*) e proteínas Fe-S (figura 8). O citocromo *c* está associado ao complexo III no lado citosólico da MMI e actua como transportador de um electrão entre os complexos III e IV. Ao mesmo tempo, quatro prótons atravessam a MMI contribuindo para o gradiente de prótons (Garrett *et al*, 1995, [8]).







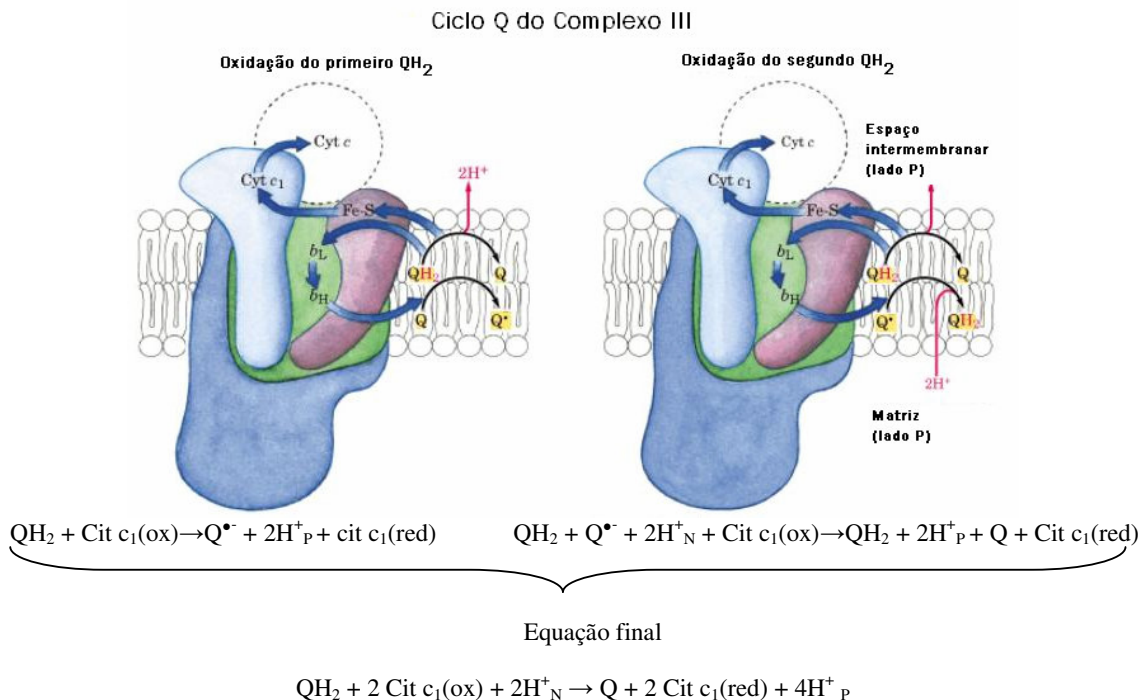
**Figura 8 - Estrutura do complexo III da cadeia respiratória.** Este complexo (250 kDa) é um homodímero constituído por 11 cadeias polipeptídicas/monómero. Contém citocromos com grupos prostéticos hema e proteínas de Rieske Fe-S com grupos prostéticos 2Fe-2S. O citocromo *c* está associado com o complexo III no lado citosólico da MMI e transporta 1 electrão entre este complexo e o complexo IV. A transferência de electrões está associada com o transporte de protões da matriz para o espaço intermembranar. Adaptado de Nelson *et al*, 2004 in [8]

O mecanismo que associa a transferência de electrões, de Q para o citocromo *c*, com o transporte transmembranar de protões é designado por ciclo Q (figura 9). O ciclo Q também facilita a ligação entre um transportador de dois electrões ( $\text{QH}_2$ ) e um transportador de um electrão (citocromo *c*). O ciclo inicia-se com a ligação de um  $\text{QH}_2$  com o local  $\text{Q}_o$  transferindo um electrão de cada vez. Um electrão vai para o grupo Rieske 2Fe-2S, segue para o citocromo  $c_1$  e finalmente para o citocromo *c* que fica reduzido. Um segundo electrão é transferido primeiro para o citocromo  $b_L$ , depois para o citocromo  $b_H$  e finalmente para uma quinona oxidada ligada ao local  $\text{Q}_i$ . Esta molécula de quinona (Q) é reduzida a uma semiquinona ( $\text{Q}^{\bullet-}$ ). Conforme  $\text{QH}_2$  no local  $\text{Q}_o$  é oxidado a Q, os seus protões são libertados no espaço intermembranar. Esta molécula Q sai do local  $\text{Q}_o$  e difunde-se para o “pool” de quinonas.

A semiquinona ( $\text{Q}^{\bullet-}$ ) permanece no local  $\text{Q}_i$ . Uma segunda molécula de  $\text{QH}_2$  liga-se ao local  $\text{Q}_o$  e reage do mesmo modo que a primeira. Um dos electrões é transferido através do centro Rieske e citocromo  $c_1$  para uma segunda molécula de citocromo *c*. O outro electrão segue através do citocromo  $b_L$  e  $b_H$  para a semiquinona do local  $\text{Q}_i$ . Com a adição de um segundo electrão esta semiquinona capta dois protões da matriz mitocondrial formando  $\text{QH}_2$ . A retirada destes dois protões da matriz contribui



para a formação de um gradiente de protões. No fim deste ciclo são oxidadas duas moléculas de  $\text{QH}_2$  para formar duas moléculas de  $\text{Q}$  e uma molécula de  $\text{Q}$  é reduzida a  $\text{QH}_2$ , são reduzidas duas moléculas de citocromo  $c$ , 4 protões são libertados no espaço intermembranar e dois protões são removidos da matriz mitocondrial (Berg *et al*, 2002).

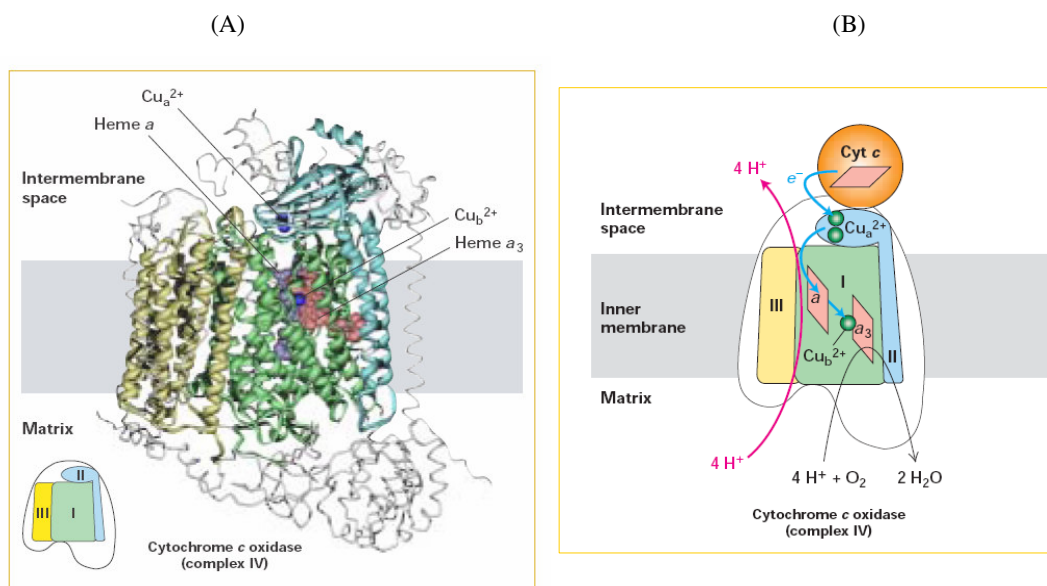


**Figura 9 - Ciclo Q do Complexo III da cadeia respiratória.** Oxidação da primeira  $\text{QH}_2$ : a  $\text{QH}_2$  é reduzida a  $\text{Q}$  no local  $\text{Q}_o$ , resultando na transferência de 2 protões para o espaço intermembranar e na passagem de 1 electrão para o centro Rieske Fe-S, que o transfere para o citocromo  $c_1$ . O outro electrão vai para o citocromo  $b_L$  que o transfere para o citocromo  $b_H$ ; este cede o electrão a uma quinona do “pool” de quinonas que existe no espaço hidrofóbico da MMI reduzindo-a parcialmente (semiquinona -  $\text{Q}^*$ ). Oxidação do segundo  $\text{QH}_2$ : o processo ocorre da mesma maneira que na primeira oxidação e o electrão cedido pelo  $\text{Cyt } c_1$  vai reduzir completamente o intermediário semiquinona a  $\text{QH}_2$  que reentra para o “pool” de quinonas. Adaptado de Nelson et al, 2004 in [8]

*Complexo IV: Citocromo c oxidase.* O citocromo  $c$  oxidase é a enzima terminal da cadeia respiratória, catalizando a redução da molécula de oxigénio a duas moléculas de água, consumindo 4 protões e 4 electrões. Esta enzima é responsável pelo consumo de 90% do oxigénio pelos seres vivos na biosfera [9]. A energia livre ( $\Delta G^\circ = -55.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ) desta reacção torna possível o transporte de 4 protões adicionais da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar [10]. Tal como no complexo I e no complexo III, esta transferência electrónica resulta portanto na diminuição da concentração de  $\text{H}^+$  na matriz relativamente ao espaço intermembranar. Este complexo

respiratório é constituído por 13 subunidades, sendo três (subunidades I, II e III) codificadas pelo genoma mitocondrial e as restantes pelo genoma nuclear (figura 10).

O complexo IV recebe electrões do citocromo c e transfere-os para a molécula de oxigénio, reduzindo-a a  $H_2O$ . Para efectuar essa transferência, o complexo IV possui dois grupos hema a e três átomos de cobre (Cu) (distribuídos por um centro binuclear denominado CuA e um centro CuB associados a cada um dos grupos hema). O citocromo c transfere o seu electrão para o centro CuA. Este electrão segue então para o hema a, e deste para o hema  $a_3$ , que se encontra acoplado ao CuB (que passa da forma oxidada  $Cu^{2+}$  à forma reduzida  $Cu^+$ ). Em conjunto, este hema e o CuB podem armazenar os quatro electrões necessários para a redução do  $O_2$  a água. O complexo IV pode ser inibido por cianeto. Este anião liga-se competitivamente ao hema  $a_3$ , impedindo a transferência de electrões para a molécula de oxigénio [11].

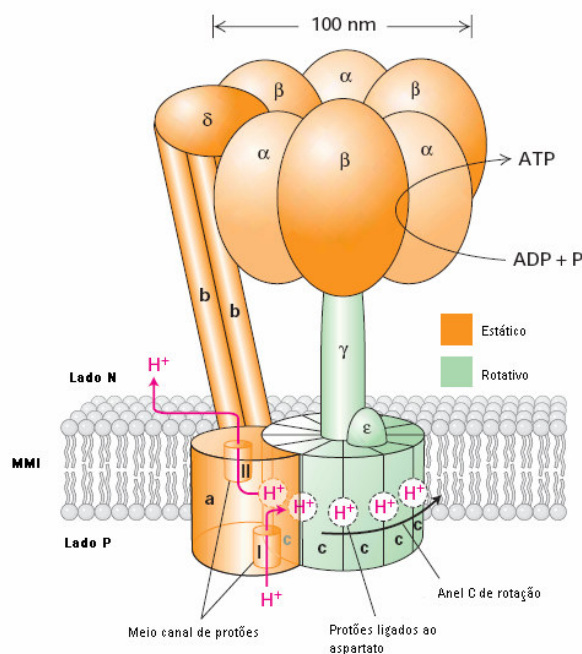


**Figura 10 - Estrutura do complexo IV (citocromo oxidase).** (A) Estrutura molecular do núcleo do complexo IV (citocromo c oxidase) na MMI. A citocromo c oxidase de mamíferos contém 13 subunidades diferentes mas o seu centro catalítico consiste unicamente em três: I (verde), II (azul claro) e III (amarelo). Estas três unidades são comuns aos procariotes. Hemas a e  $a_3$  estão a roxo e a laranja respectivamente, os três átomos de cobre são esferas azuis. (Adaptado de T. Tsukihara *et al*, 1996, *Science* 272:1136). (B) **Esquema do complexo do citocromo c oxidase mostrando o percurso dos electrões até à redução do  $O_2$ .** Os grupos hema estão indicados por losangos rosa. As setas azuis indicam o fluxo dos electrões. Quatro electrões, sequencialmente libertados a partir de quatro citocromos c reduzidos, juntamente com 4 prótons da matriz, combinam-se com uma molécula de oxigénio para formar duas moléculas de água. Adicionalmente, por cada electrão transferido do citocromo c para o oxigénio, um próton é transportado da matriz para o espaço intermembranar (num total de quatro por cada molécula de  $O_2$  reduzida a duas de  $H_2O$ ). (Ambas as figuras foram retiradas de Lodish *et al*, 2003).

**Complexo V: ATP sintetase ou complexo  $F_0F_1$ .** O complexo V é uma estrutura multiproteica constituída por dois componentes principais:  $F_1$ , uma proteína membranar periférica cujas projecções na MMI são observáveis em micrografias, e  $F_0$ , uma proteína integral da MMI. O componente  $F_1$  consiste em 5 subunidades polipeptídicas chamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ . O componente  $F_0$  contém três subunidades hidrofóbicas denominadas a, b e c (Figura 11).

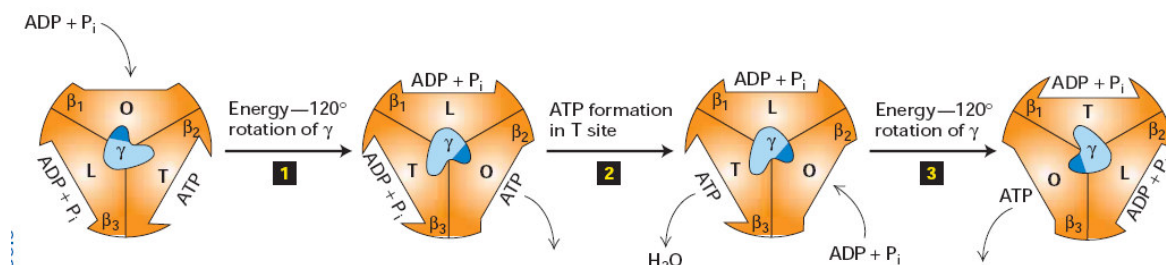
**Figura 11 - Modelo da estrutura e função da ATP sintetase.** A porção  $F_0$  é constituída por três proteínas membranares integrais (uma cópia de a, duas de b e 10 cópias de c organizadas em anel no plano da membrana). A porção  $F_1$  contém três cópias das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  constituindo um hexâmetro na extremidade da subunidade  $\gamma$  que está inserida no anel c. A subunidade  $\epsilon$  está fortemente associada à subunidade  $\gamma$  e a várias subunidades c. A subunidade  $\delta$  liga-se permanentemente a uma das unidades  $\alpha$  do complexo  $F_1$  e à subunidade b de  $F_0$ . Deste modo, as subunidades a e b, a subunidade  $\delta$  e o hexâmetro  $(\alpha\beta)_3$  formam uma estrutura rígida ligada à membrana (laranja). Durante o fluxo proteico, o anel c e as subunidades  $\gamma$  e  $\epsilon$  de  $F_1$  têm um único movimento rotativo (verde) que provoca alterações na conformação das subunidades  $\beta$  de  $F_1$  associadas à síntese do ATP.

Retirado e adaptado de Lodish *et al*, 2003.



O complexo  $F_1$  é o componente do complexo V que sintetiza o ATP conforme os prótons passam do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial. O movimento dos prótons através de  $F_0$  provoca a rotação do anel c e da subunidade  $\gamma$  e  $\epsilon$  de  $F_1$ . O componente  $F_1$  contém três locais activos (subunidades  $\beta$ ) que se encontram com conformações diferentes, designadas por L (“loose” – fraco), T (“tight” – forte) e O (“open” – aberto). A conformação T contém sempre ATP fortemente associado à subunidade. ADP e  $P_i$  ligam-se conjuntamente à enzima numa subunidade  $\beta$  com conformação O. Uma volta no hexâmetro (em resultado do movimento de prótons através do complexo) converte as três formas existentes em novas conformações. A conformação T passa a O e o ATP é libertado. O local L passa a local T, que começa a

condensar ADP+Pi em ATP. O local O recebe novas moléculas de ADP e Pi e passa a L preparando-se para formar uma nova molécula de ATP. Em cada movimento do hexâmero uma molécula de ATP é libertada (Figura 12).



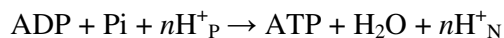
**Figura 12 - Mecanismo de síntese do ATP no complexo  $F_0F_1$ .** Cada uma das subunidades  $\beta$  de  $F_1$  alterna entre três estados conformacionais que diferem na sua afinidade com o ATP, ADP e Pi. **1** – Após a ligação do ADP e Pi a uma subunidade  $\beta$  com a conformação O ( $\beta_1$  neste caso), o fluxo de prótons provoca uma rotação de  $120^\circ$  da subunidade  $\gamma$  (em relação às subunidades  $\beta$  fixas). Isto provoca a alteração da conformação  $\beta_1$  para L e um aumento da afinidade com ADP + Pi. Também as restantes subunidades sofrem alterações das conformações:  $\beta_2$  (de T para O) e  $\beta_3$  (de L para T). **2** – O ADP + Pi no local T (subunidade  $\beta_3$  neste caso) origina ATP, numa reacção que não necessita de um input de energia, e novas moléculas de ADP+Pi ligam-se à subunidade  $\beta_2$  que se encontra na conformação O. A alteração da conformação das subunidades resulta num complexo  $F_1$  idêntico ao inicial (à esquerda) mas com uma rotação de  $120^\circ$ . **3** – Outra rotação de  $120^\circ$  da subunidade  $\gamma$  provoca a alteração da conformação das subunidades  $\beta$  de  $O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow O$ . A repetição dos passos **1** e **2** leva à formação de três moléculas de ATP por cada  $360^\circ$  de rotação da subunidade  $\gamma$ .

(Adaptado de Boyer, 1989, *FASEB J.* 3:2164, e Zhou *et al.*, 1997, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 94:10583. in Lodish *et al.*, 2003)

A fosforilação oxidativa é o culminar do metabolismo energético nos organismos aeróbios. Todos os passos oxidativos na degradação dos hidratos de carbono, lípidos e aminoácidos convergem na fase final da respiração celular, na qual a energia de oxidação leva à síntese de ATP. Nos eucariontes, a fosforilação oxidativa ocorre na mitocôndria envolvendo a redução do  $O_2$  a  $H_2O$  através dos electrões cedidos pelo NADH e  $FADH_2$  (Nelson *et al.*, 2004).

Peter Mitchell propôs que a energia livre resultante do transporte de electrões conduzia à formação de um sistema de transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar: *modelo quimiosmótico*. É, assim, criado um gradiente electroquímico de prótons, com um valor de pH mais baixo no espaço intermembranar do que na matriz. De acordo com o modelo quimiosmótico a energia electroquímica inerente à essa diferença de concentração de prótons entre os dois lados da MMI leva à síntese de ATP conforme os prótons regressam passivamente à matriz através de um

poro de prótons associado à ATP sintetase. A equação para a síntese do ATP pode ser escrita da seguinte forma



Os prótons do espaço intermembranar têm uma tendência termodinâmica para regressar à matriz e a energia livre associada ao gradiente é dissipada (21KJ/mol de prótons) sendo alguma utilizada na síntese de ATP (Lodish *et al*, 2003). A relação entre o número de prótons transportados por cada par de electrões que percorrem a CTE (razão  $\text{H}^+/\text{2e}^-$ ) ainda não foi unanimemente estabelecida. O maior consenso estipula que, para a via de transporte de electrões a partir do succinato até ao oxigénio, seja  $6\text{H}^+/\text{2e}^-$ . A razão aceite para o complexo I, sozinho, é de  $4\text{H}^+/\text{2e}^-$ . Com base neste cálculo a estequiometria do transporte pela via do NADH até ao oxigénio seria de  $10\text{H}^+/\text{2e}^-$  (Garrett *et al*, 1995).

### ***Oxigénio e rendimento energético***

Na ausência de oxigénio os seres vivos anaeróbios obrigatórios e facultativos convertem a glicose em compostos de 2 ou 3 carbonos que são libertados para o meio. Através do processo de glicólise a glicose é degradada a piruvato gerando um saldo de 2 ATP. São também formadas 2 moléculas de NADH que, na ausência de oxigénio, vão ser oxidadas a  $\text{NAD}^+$  via fermentação láctica (com formação de ácido láctico) ou via fermentação alcoólica (com formação de  $\text{CO}_2$  e etanol). Tendo em conta que a energia livre potencial presente nas ligações químicas da glicose é de 2937 kJ/mol e que a hidrólise do ATP tem um  $\Delta G^\circ$ , sob condições fisiológicas, de -50 kJ/mol (-12 kcal/mol), o rendimento energético obtido através de um processo fermentativo é de apenas 3,4%, correspondente ao saldo de 2 ATP (Berg *et al*, 2002)<sup>1</sup>.

O aparecimento do oxigénio e o desenvolvimento de um processo oxidativo que degrada a glicose até  $\text{CO}_2$  e usa o  $\text{O}_2$  como aceitador final dos electrões veio permitir um melhor aproveitamento energético e tornou possível o aumento da complexidade dos seres vivos. No processo aeróbio, a maioria da energia livre libertada durante o processo de degradação é retida sob a forma de coenzimas reduzidas NADH e  $\text{FADH}_2$  geradas durante a glicólise e o ciclo do ácido cítrico. Através da CTE os electrões

---

<sup>1</sup> No Anexo E são apresentadas algumas noções gerais sobre termodinâmica aplicada aos sistemas biológicos.

cedidos pelo NADH e  $\text{FADH}_2$  são transportados através de um conjunto de transportadores e transferidos para o  $\text{O}_2$  que é reduzido a  $\text{H}_2\text{O}$ . As reacções de oxidação do NADH e  $\text{FADH}_2$  são muito exergónicas tendo como valores de  $\Delta G^\circ$  -52,6 e -43,4 kcal/mol, respectivamente. A oxidação da glicose via glicólise e ciclo do ácido cítrico origina 10 NADH e 2  $\text{FADH}_2$  (ver quadro 2). A oxidação destas coenzimas dá um total de energia livre de aproximadamente 613 kcal/mol [ $10 \times (-52,6) + 2 \times (-43,4)$ ]. Uma vez que o potencial de energia livre da glicose é 680 kcal/mol, cerca de 90% dessa energia é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas (Lodish *et al*, 2003).

**Quadro 2 - Número de moléculas de NADH e  $\text{FADH}_2$  formadas durante o processo de respiração aeróbia**

	NADH	$\text{FADH}_2$
Glicólise	2 (cit)	0
Oxidação do piruvato	2	0
Ciclo do ácido cítrico	6	2
Total	10	2

O NADH formado durante a glicólise é citosólico e não conseguem entrar na mitocôndria pelo que a passagem dos seus equivalentes redutores é feita através de transportadores (shuttles) para coenzimas mitocôndriais. Se for usado o shuttle do malato-aspartato os equivalentes redutores do NADH citosólico passam para NADH da matriz entrando na CTE ao nível do complexo I (mais comum em células de fígado, rim e coração). Se for usado o shuttle do glicerol-3-fosfato os equivalentes redutores do NADH citosólico passam para  $\text{FADH}_2$  e são cedidos à ubiquinona na MMI que os cede ao complexo III da CTE (mais comum em células musculares e cerebrais).

A energia livre libertada durante a oxidação de uma única molécula de NADH ou  $\text{FADH}_2$  pelo oxigénio é suficiente para sintetizar várias moléculas de ATP. A mitocôndria maximiza a produção de ATP através da transferência de electrões do NADH e  $\text{FADH}_2$  para o oxigénio usando a CTE. Esta transferência dos electrões de um transportador para outro vai permitir que a energia livre do NADH e  $\text{FADH}_2$  seja libertada gradualmente e armazenada sob a forma de um gradiente electroquímico (Lodish *et al*, 2003).

O número de moléculas de ATP formadas ao nível do substrato, nas reacções de glicólise e no ciclo do ácido cítrico, é fácil de determinar pela estequiometria das reacções químicas. No entanto, o número de ATP formados por fosforilação oxidativa é difícil de calcular porque tem a ver com a estequiometria das bombas de protões e da ATP sintetase. O valor de 3 ATP, de há muito estabelecido quando o aceitador é o  $\text{NAD}^+$  mitocondrial, e o de 2 ATP quando o aceitador é o FAD, têm vindo

sucessivamente a ser corrigidos. Os últimos valores geralmente aceites são os que foram apresentados por Hinkle e colaboradores em 1991, e baseiam-se na estimativa do número de  $H^+$  bombeados (por par de electrões) da matriz para o espaço intermembranar pelos complexos I ( $4H^+$ ), III ( $2H^+$ ) e IV ( $4H^+$ ) (Hinkle *et al*, 1991). A síntese de cada ATP é realizada em associação com o fluxo de  $3H^+$  através da ATP sintetase, sendo consumido mais um  $H^+$  no transporte de cada ATP da matriz para o citoplasma, onde vai ser utilizado. Assim sendo, por cada par de electrões transportados do NADH para o  $O_2$  formar-se-ão 2,5 ATP (por cada par de electrões que entra no complexo I da CTE são transportados 10  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranar sendo gastos 4  $H^+$  para a síntese do ATP e seu transporte para o citosol –  $10/4 = 2,5$ ). Nos casos em que o aceitador mitocondrial é o sistema FAD/CoQ, isto é, quando o substrato é o succinato ou quando há intervenção do NADH citoplasmático pelo “shuttle” do glicerol-3-fosfato, formam-se 1,5 ATP por cada par de electrões transferido (Campos, 2002; Berg *et al*, 2002).

Como já foi referido, na presença de oxigénio o piruvato formado na glicólise é transportado para dentro da mitocôndria e oxidado até  $CO_2$ . O NADH e  $FADH_2$  formados durante estes processos cedem os seus electrões à CTE levando à síntese de 28 ATP por molécula de Glicose (quadro 3).

**Quadro 3 - Número de moléculas de ATP formadas durante o processo de respiração aeróbia e respectivo valor energético**

	Nº de moléculas de ATP	Energia armazenada (kJ/mol)
Glicólise	2	100
Ciclo do ácido cítrico	2	100
Fosforilação oxidativa	28 (26)	1400 (1300)
Total	32 (30)	1600 (1500)
Rendimento energético		54% (51%)

A maioria do ATP sintetizado é produzida pela fosforilação oxidativa; apenas 4 ATP são sintetizados directamente durante a glicólise e no ciclo do ácido cítrico. Os valores entre parêntesis referem-se à entrada dos equivalentes redutores da glicólise pelo shuttle do glicerol-3-fosfato. O rendimento energético final foi calculado com base no valor de  $\Delta G_0$  da glicose de 2937 kJ/mol.

Quanta energia uma célula eucarótica extrai de uma molécula de glicose? Assumindo 50 kJ/mol como valor de hidrólise do ATP, em condições fisiológicas, a produção de 32 ATP por molécula de glicose permitirá obter 1600 kJ/mol de glicose. A



oxidação celular (combustão) da glicose contem uma energia livre de -2937 kJ/mol. A eficiência do processo de respiração aeróbia será de

$$\frac{1600}{2937} \times 100\% = 54\%.$$

Comparando o rendimento energético do processo fermentativo (3,4%) com o que se obtém através de um processo aeróbio (54%) é possível concluir que os seres vivos que conseguiram adaptar-se a um ambiente oxidativo retiraram vantagens. Garrett *et al* (1995) afirma que o actual valor para a eficiência do processo aeróbio “é o resultado de aproximadamente 3,5 biliões de anos de evolução”. No entanto, muita energia contida nas moléculas orgânicas ainda é perdida pelo que os actuais seres vivos ainda podem evoluir no sentido de um melhor aproveitamento energético.

### **...aos efeitos deletérios.**

A toxicidade do O<sub>2</sub> nos seres humanos tornou-se assunto de interesse relacionado com o mergulho ou no uso de O<sub>2</sub> hiperbárico para tratamento de doenças como cancro, infecções, esclerose múltipla e doenças pulmonares. Um aumento na pressão parcial de O<sub>2</sub> ao qual um organismo está submetido pode ser conseguido através do aumento da percentagem de O<sub>2</sub> no ar mas também, como no mergulho, através do aumento na pressão total.

Uma alta pressão de O<sub>2</sub> geralmente provoca toxicidade no sistema nervoso central dos animais, levando a convulsões. Pressões de oxigénio 50% superiores a uma atmosfera (pressão parcial de oxigénio ao nível do mar) danificam gradualmente os pulmões; as células endoteliais que limitam os capilares são também muito sensíveis a níveis elevados de O<sub>2</sub> e exposições prolongadas podem mesmo causar morte das células epiteliais alveolares (*in Halliwell et al*, 1999).

Talvez a primeira sugestão para explicar a toxicidade provocada pelo O<sub>2</sub> tenha sido de que este inibia certas enzimas celulares. Contudo, a taxa de inactivação directa de enzimas pelo O<sub>2</sub> nas células aeróbias é tão lenta e tão limitada em extensão que, no geral, se pode afirmar que a maioria das enzimas não é grandemente afectada pelo O<sub>2</sub>. Em 1945, R. Gershman e D. L. Gilbert fizeram um paralelismo entre os efeitos



provocados pelo  $O_2$  e aqueles provocados pelas radiações ionizantes e propuseram que os efeitos prejudiciais do  $O_2$  deveriam ser atribuídos não ao oxigénio molecular mas sim à formação de radicais livres de oxigénio, resultantes da acção das referidas radiações [12].

*Radicais livres* podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais electrões desemparelhados (*in Valko et al*, 2006). A presença de electrões desemparelhados confere-lhes, geralmente, um considerável grau de reactividade. O termo *radical livre* engloba quer as espécies reactivas de oxigénio (ROS) quer as espécies reactivas de nitrogénio (RNS). Este tipo de moléculas são actualmente reconhecidas como desempenhando um papel importante nos seres vivos tanto pelos seus efeitos benéficos como pelos efeitos deletérios. Entre os radicais livres gerados em sistemas vivos, os derivados do oxigénio representam a classe mais importante.

### ***Espécies reactivas de oxigénio***

A formação de radicais livres de oxigénio ou espécies reactivas de oxigénio (ROS) é uma consequência da vida aeróbia e é inevitável. As espécies reactivas de oxigénio representam uma fonte constante de ataques ao nosso material genético que podem ser ampliadas a parcialmente reduzidas por influências nutricionais, hormonais e ambientais.

As espécies reactivas de oxigénio podem ser geradas durante a irradiação por luz UV, raios X ou radiação gama, podem resultar de reacções catalizadas por metais, presentes na atmosfera como poluentes, são produzidos pelo metabolismo, em geral e pela cadeia transportadora de electrões mitocondrial, em particular (Cadenas, 1989). As espécies reactivas de oxigénio são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbios, resultando um estado de equilíbrio entre as concentrações fisiológicas requeridas para um funcionamento normal das células e sua produção excessiva ou stresse oxidativo. O termo ROS implica uma produção intracelular de intermediários de oxigénio que ameaçam a integridade de várias biomoléculas incluindo proteínas, lípidos e DNA. O stresse oxidativo daí resultante está envolvido no processo de envelhecimento quer por indução de danos no DNA mitocondrial que por outros mecanismos (Nordberg *et al*, 2001).

As ROS podem ser produzidas a partir de substâncias endógenas ou exógenas. Potenciais fontes endógenas de ROS incluem a mitocôndria, o metabolismo do

citocromo P450 ou a activação celular na resposta inflamatória, de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Como fontes exógenas podemos destacar certos agentes ambientais ou agentes xenobióticos. Compostos clorados, iões metálicos e alguns barbitúricos são alguns exemplos deste tipo de agentes (*in Valko et al*, 2006).

No quadro 4, estão listadas as formas mais comuns de ROS intracelulares com indicação da respectiva fonte e dos sistemas enzimáticos antioxidantes que contra elas actuam (*in Halliwell et al*, 1999).

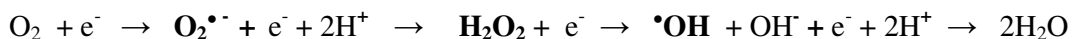
**Quadro 4 - Principais espécies reactivas de oxigénio (ROS), fonte principal e sistema de defesa envolvido**

ROS	Fonte principal	Sistemas de defesa enzimáticos	Produtos
Superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )	“Ligação” de electrões provenientes da cadeia de transporte de electrões (CTE) Actividade de fagócitos Xantina oxidase Flavoenzimas	Superóxido dismutase (SOD) Superóxido reductase (em algumas bactérias)	$H_2O_2 + O_2$ $H_2O_2$
Peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ )	A partir de $O_2^{\bullet -}$ via superóxido dismutase (SOD) NADPH-oxidase (neutrófilos) Glucose oxidase Xantina oxidase	Glutathione peroxidase Catalases Peroxirredoxina (Prx)	$H_2O_2 + GSSG$ $H_2O_2 + O_2$ $H_2O_2$
Radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ )	A partir de $O_2^{\bullet -}$ e $H_2O_2$ via transição de metais (Fe ou Cu)		
Óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ )	Óxido nítrico sintetase	Glutathione /TrxR	GSNO

Um ponto em sobrescrito na fórmula é geralmente usado para designar um radical livre ( $H^{\bullet}$ )

### **Química e bioquímica das ROS**

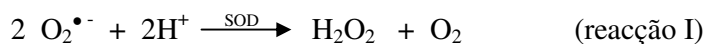
A redução passo a passo do oxigénio molecular via transferência de 1 electrão, produz e interliga as espécies reactivas de oxigénio listadas na tabela, conforme esquematizado na reacção seguinte:



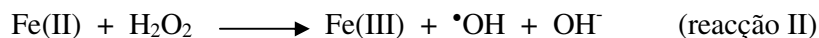
O anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) forma-se a partir do oxigénio por adição de um electrão sendo considerado como uma ROS “primária” que pode interagir com outras moléculas para formar ROS “secundárias”. Apesar de ser um radical livre, não é muito reactivo. Não consegue penetrar nas membranas lipídicas e permanece no

compartimento celular onde é produzido. A formação de superóxido tem lugar espontaneamente, especialmente em ambientes aeróbios ricos em electrões tais como a cadeia transportadora de electrões da MMI. Também as flavoenzimas, as lipoxigenases e as ciclooxigenases são produtoras do anião superóxido. Por sua vez, duas moléculas de superóxido podem ser dismutadas a peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular na presença de superóxido dismutase (SOD) (Nordberg *et al*, 2001).

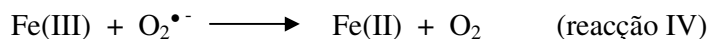
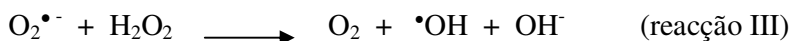
A enzima SOD acelera as reacções de dismutação (reacção I) nos sistemas biológicos actuando em associação com enzimas que removem o peróxido de hidrogénio tais como as catalases e a glutathione peroxidase (*in Valko et al*, 2006)



A geração de vários radicais livres está intimamente relacionada com a participação de metais com actividade redox. O estado redox celular está, em grande medida, associado a pares redox com ferro (e, por vezes, cobre) sendo este mantido sob limites fisiológicos apertados. Verifica-se que, *in vivo* e sob condições de stresse, a concentração de anião superóxido aumenta e há libertação de átomos de ferro das moléculas que o continham. O Fe(II) libertado pode participar na reacção de Fenton (reacção II) originando um radical hidroxilo, altamente reactivo.



Sob condições de stresse o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  actua como um oxidante dos centros ferro-enxofre das enzimas e facilita a produção do radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , disponibilizando Fe(II) para a reacção de Fenton. O radical superóxido também participa na reacção de Haber-Weiss (reacção III), que combina a reacção de Fenton com a redução do Fe(III) pelo superóxido, permitindo a reciclagem do Fe(II) e libertando oxigénio (reacção IV) (Nordberg *et al*, 2001).



O peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) embora não seja um radical livre tem um papel muito importante devido à sua capacidade para penetrar nas membranas biológicas. Intervém na formação de radicais livres funcionando como um intermediário na formação de ROS. Na remoção do peróxido de hidrogénio podem actuar, entre outros, três sistemas enzimáticos: catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas (Nordberg *et al*, 2001).

Devido à sua grande reactividade com as biomoléculas, o radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) é provavelmente capaz de causar maiores danos nos sistemas biológicos que qualquer outra espécie reactiva de oxigénio. O seu tempo de semi-vida, em meio aquoso, é menor que 1 ns pelo que, quando produzido *in vivo*, reagem perto do local de formação (in Valko *et al*, 2006). O radical hidroxilo é formado a partir do peróxido de hidrogénio numa reacção catalizada por iões metálicos de transição ( $\text{Fe}^+$  ou  $\text{Cu}^+$ , entre outros), geralmente associados a complexos de diferentes proteínas ou outras moléculas (Nordberg *et al*, 2001; Halliwell *et al*, 1999). A formação de  $\bullet\text{OH}$  perto do DNA permite que este radical se ligue às bases de DNA ou à estrutura de desoxirribose provocando danos.

O óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) tem alguns aspectos semelhantes ao superóxido uma vez que não reage com a maioria das biomoléculas apesar de ter um electrão desemparelhado. No entanto, reage facilmente com outros radicais livres aprisionando-os e funcionando mais como um anti-oxidante do que como um oxidante. No entanto, alguns produtos de reacção do óxido nítrico com outros radicais livres podem ser muito tóxicos ao nível celular. O  $\bullet\text{NO}$  é solúvel em meio aquoso e lipídico pelo que consegue atravessar as membranas celulares difundindo-se através do citoplasma onde pode actuar como uma molécula sinalizadora. Neste caso pode constituir um factor importante no controlo de funções celulares (Nordberg *et al*, 2001; in Valko *et al*, 2006).

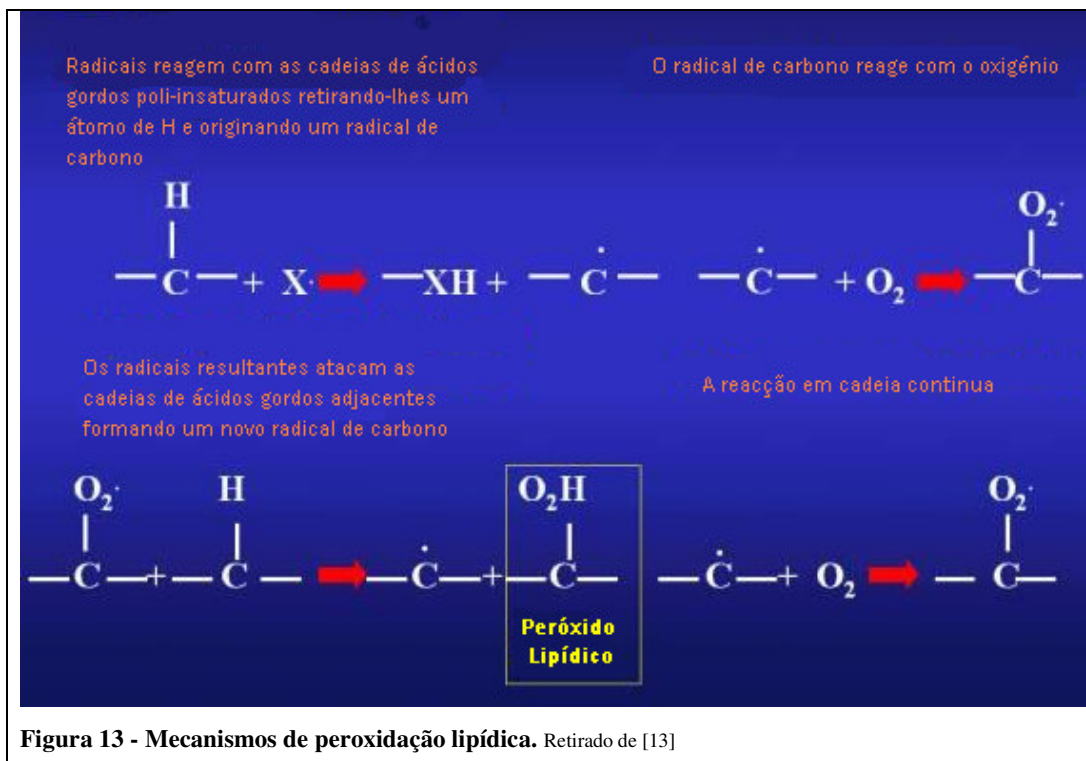
### ***Efeitos deletérios das ROS***

Para o bom funcionamento celular é necessário um equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. A alteração do estado de equilíbrio a favor da condição pró-oxidante pode provocar danos celulares tendo como consequência o ataque a biomoléculas como o DNA, os lípidos em geral, as proteínas e os hidratos de carbono.

*Dano oxidativo no DNA nuclear e mitocondrial.* O radical hidroxilo reage com todos os componentes da molécula de DNA (bases púricas e pirimídicas, e esqueleto de desoxirribose). A modificação permanente do material genético resultante desde dano oxidativo representa o primeiro passo de fenómenos de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento. Os danos no DNA nuclear induzidos por ROS envolvem a clivagem da ligação fosfodiéster, a alteração da ribose e a oxidação das bases. Pode também impedir ou induzir a transcrição, provocando instabilidade genómica e replicação de erros; todos estes aspectos podem ser associados à carcinogénese. Também o DNA mitocondrial pode ser danificado por ROS. Este DNA é mais susceptível à oxidação que o DNA nuclear devido ao facto de, em condições fisiológicas, a mitocôndria converter aproximadamente 5% do oxigénio em anião superóxido e, conseqüentemente, em  $H_2O_2$ . Adicionalmente, o DNA mitocondrial não se encontra protegido por histonas e a sua capacidade de reparação é limitada. Mutações e alterações da expressão dos genes mitocondriais que codificam os complexos I, III, IV e V, e das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial, foram identificadas em vários cancros humanos (*in Valko et al*, 2006).

*Peroxidação lipídica.* A formação de radicais livres em reacções catalisadas por metais de transição levam ao ataque de resíduos de ácidos gordos poli-insaturados constituintes dos fosfolípidos de membrana, particularmente sensíveis à oxidação por possuírem várias ligações duplas. Este processo leva à desintegração das membranas das células permitindo, deste modo, a entrada dessas espécies reactivas nas estruturas intracelulares. (Halliwell *et al*, 1999). No processo de peroxidação lipídica é possível distinguir três passos: iniciação, propagação e terminação. A peroxidação pode ser induzida por radicais suficientemente reactivos para remover um átomo de hidrogénio aos ácidos gordos poli-insaturados. Este é o início de um ciclo de propagação que leva ao aumento da produção de radicais livres e ao aumento de hidroperóxidos lipídicos formados por oxidação de inúmeras moléculas lipídicas (Figura 13). Este ciclo de propagação é quebrado quando dois radicais se juntam, formando não- radicais. Estas últimas reacções designam-se de reacções de terminação (Lehuédé *et al*, 1999). As fosfolipases, em geral, activadas pelas espécies tóxicas actuam sobre os fosfolípidos membranares, libertando os ácidos gordos não saturados, o que resulta na ruptura das membranas celulares e na formação de resíduos químicos como o malonildialdeído cuja quantificação constitui um método de avaliação da peroxidação lipídica. A peroxidação

lipídica tem, também, um papel muito importante na inibição da proliferação celular, especialmente em células tumorais, na arteriosclerose e inflamação. Há autores que sugerem que os produtos da lipoperoxidação estão envolvidos no controlo da divisão celular, sendo que a peroxidação de lípidos está inversamente relacionada com o crescimento tumoral (Gonzalez, 1992).



*Oxidação proteica.* Os danos oxidativos causados em proteínas resultam na fragmentação das cadeias polipeptídicas, formação de ligações proteína-proteína e modificações dos aminoácidos das cadeias laterais em derivados de hidroxilos ou carbonilos (Fagan *et al*, 1999). A quantificação de grupos carbonilo é um dos indicadores da oxidação proteica mais utilizado e a sua acumulação já foi relacionada com o envelhecimento e algumas doenças (Dalle-Donne *et al*, 2003). Grande parte dos danos oxidativos das proteínas são passíveis de serem reparados e geralmente não são letais embora, em situações de stresse oxidativo prolongado, possam estender-se a proteínas mitocondriais como a aconitase e a translocase de nucleótidos (*in* Valko *et al*, 2006), com todas as consequências daí resultantes.

### ***Mecanismos de defesa antioxidante***

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, consiga reduzir ou prevenir a sua oxidação. Uma defesa antioxidante pode compreender agentes que removem cataliticamente os radicais livres e outras espécies reactivas, agentes proteicos que diminuem a disponibilidade de pró-oxidantes, proteínas que protegem biomoléculas de danos, como as proteínas de choque térmico, ou agentes de baixo peso molecular que fixam ROS como algumas vitaminas (Halliwell *et al*, 1999). Um bom anti-oxidante deve: (1) destruir especificamente radicais livres; (2) complexar metais redox; (3) interagir com (regenerar) outros anti-oxidantes; (4) ser facilmente absorvido; (5) estar numa concentração relevante nos tecidos e fluidos corporais, em condições fisiológicas; (6) actuar em ambos os ambientes aquoso e lipídico (Valko *et al*, 2006).

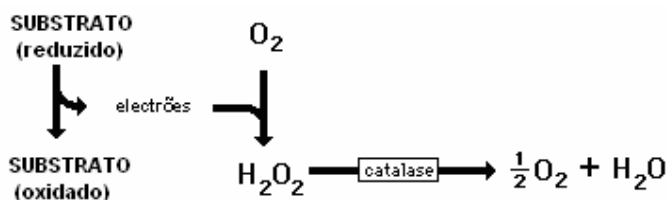
A eliminação de ROS pode ser feita através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas envolvidas na protecção antioxidante primária do organismo humano incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutational peroxidase (Gpx), a glutational redutase (Gr), a glutational S-transferase (GST), a catalase, a tioredoxina redutase (Trx) e outras enzimas que catalisam reacções geradoras de equivalentes redutores no citoplasma ou na mitocôndria. Através das enzimas antioxidantes, SOD, Gpx, Gr e catalase, o organismo mantém as concentrações de ROS dentro de níveis fisiológicos e, através do sistema Trx, regula o teor de espécies moleculares oxidadas (Ribeiro *et al*, 2005).

#### ***Defesas antioxidantes enzimáticas.***

A *superóxido dismutase* (SOD), uma das defesas antioxidantes mais eficientes, catalisa a dismutação do anião superóxido em oxigénio e numa espécie menos reactiva a curto prazo, o peróxido de hidrogénio. A superóxido dismutase existe sob diferentes isoformas diferindo na natureza do metal no centro activo, na constituição em aminoácidos, no número de subunidades e de cofactores. Nos seres humanos há três formas de SOD: a citosólica com cobre e zinco (CuZn-SOD), a mitocondrial com manganésio (Mn-SOD) e a extracelular (EC-SOD). A superóxido dismutase destrói o anião superóxido, de uma forma muito eficiente, através de oxidações e reduções sucessivas do ião metálico do centro activo (*in* Valko *et al*, 2006).

A *catalase* é uma enzima que existe em praticamente todos os organismos aeróbios. A sua principal função nas células é prevenir a acumulação de peróxido de hidrogénio a

níveis tóxicos. Cada molécula de catalase tem quatro cadeias polipeptídicas, cada uma composta por mais de 500 aminoácidos. Encaixado dentro desta tetrada existem quatro grupos hema-porfirina – muito semelhante a moléculas como a hemoglobina, citocromos, clorofilas e enzimas fixadoras de azoto nas leguminosas. A catalase pode também intervir em muitas reacções oxidativas que ocorrem nas células. Na ausência da catalase a reacção de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre espontaneamente mas muito mais devagar [14]. O peróxido de hidrogénio pode formar-se por redução do oxigénio sendo depois degradado em água e oxigénio através da acção catalítica da catalase.



A sequência completa de aminoácidos da catalase bovina já é conhecida desde 1982 e a sua estrutura tridimensional foi determinada por M. Murthy e colaboradores em 1981 (figura 14). A catalase de mamíferos contém ainda 4 moléculas de NADPH firmemente ligadas. Este dinucleótido não é essencial para a actividade da enzima mas diminui a sua susceptibilidade à inactivação quando fica exposta a altas concentrações do seu substrato tóxico, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kirkman *et al*, 1984).

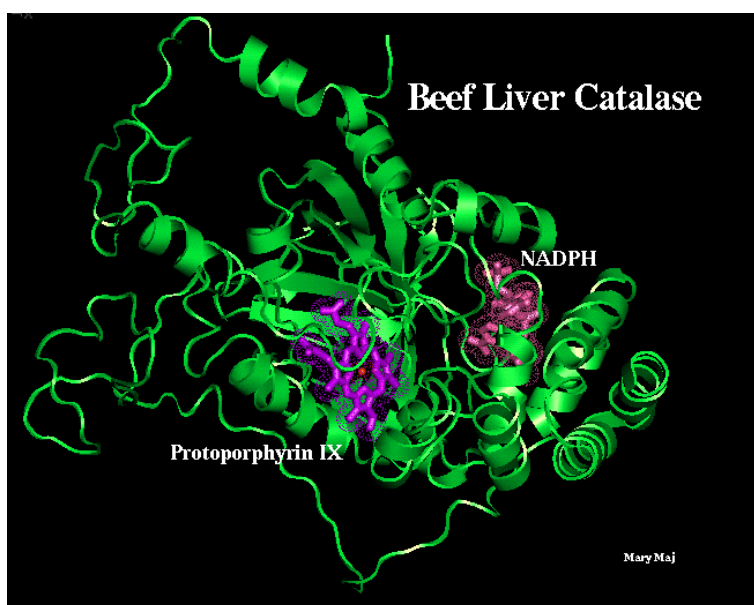


Figura 14- Estrutura tridimensional de uma subunidade da catalase (o Fe está sempre sob a forma férrica e aparece na imagem a vermelho no anel de protoporfirina). Retirado de [15]



A *Glutathione peroxidase* (GPx) é uma enzima que constitui um dos mecanismos de defesa antioxidante mais importantes. A glutathione peroxidase humana é selénio dependente e actua através da adição de dois electrões para reduzir peróxidos e formar grupos Se-OH. As propriedades antioxidantes deste tipo de enzimas permite-lhes eliminar peróxidos evitando que entrem na reacção de Fenton. Deste modo, a GPx compete com a catalase pelo  $H_2O_2$  como substrato e é a principal protecção em níveis baixos de stress oxidativo (Valko *et al*, 2006).

O sistema *tiorredoxina* consiste em duas proteínas tiorredoxina (Trx) com actividade oxirredutora e uma enzima tiorredoxina redutase (TrxR) (Nordberg *et al*, 2001). A tiorredoxina é uma proteína polivalente contendo duas cisteínas no local activo (Cys-Gly-Pro-Cys). Contém dois grupos -SH na sua forma reduzida que são convertidos numa unidade dissulfito quando está na forma oxidada (in Valko *et al*, 2006; Halliwell *et al*, 1999).

#### *Defesas antioxidantes não enzimáticas*

A protecção antioxidante, por mecanismos não enzimáticos, é feita por moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação por apresentarem uma das propriedades atrás referidas: supressão da formação de radicais livres (complexação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou sua desactivação (formando um produto estável) e participação em processos de reparação.

A *vitamina C* (ácido ascórbico) é um forte antioxidante que actua em meio aquoso. Pode actuar em conjunto com a vitamina E, e carotenóides assim como com enzimas anti-oxidantes. A pH fisiológico 99,9% da vitamina C está presente sob a forma  $AscH^-$ , que actua como um dador antioxidante, originando um radical livre ascorbato ( $AscH^\bullet$ ) que geralmente não se encontra protonado ( $Asc^\bullet$ ). Este radical semidehidroascorbato é muito pouco reactivo podendo-se considerar como terminal. Muitos estudos mostram que a suplementação da dieta com vitamina C reduz os danos oxidativos em DNA, lípidos e proteínas (in Valko *et al*, 2006).

A *vitamina E* é uma vitamina lipossolúvel. Entre as diferentes formas da vitamina E, o  $\alpha$ -tocoferol, que é a sua forma solúvel, é também a mais activa nos humanos sendo um poderoso antioxidante biológico. A sua função antioxidante mais importante é contra a peroxidação lipídica.

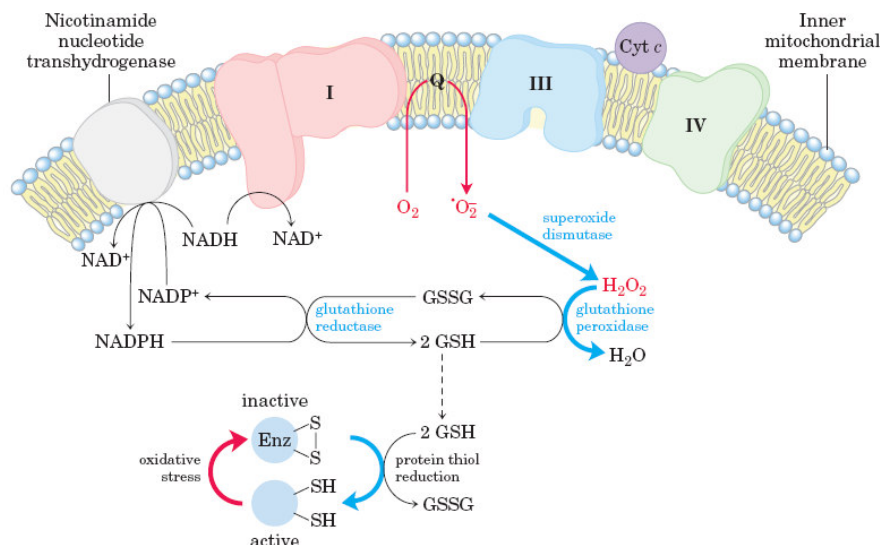
O maior antioxidante de grupos tiol é a *glutathione* (GSH), um antioxidante não enzimático, intracelular e polivalente. A capacidade antioxidante dos compostos tiol deve-se ao átomo de enxofre que facilmente se adapta à perda de um electrão. A glutathione (GSH) desempenha um papel protector contra o stresse oxidativo actuando como cofactor de algumas enzimas desintoxicantes contra o stress oxidativo (glutathione peroxidase, por exemplo), participando no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e complexando o radical hidroxilo e o oxigénio singlete directamente (actuando sobre o peróxido de hidrogénio e sobre os peróxidos lipídicos através da acção catalítica da glutathionaperoxidase). É também capaz de regenerar os antioxidantes mais importantes (Vitaminas C e E) tornando-os activos (*in Valko et al, 2006*).

Outros antioxidantes não enzimáticos importantes são o ácido lipóico, os carotenóides os flavonóides e o selénio, entre outros.

### ***A mitocôndria na formação de espécies reactivas de oxigénio***

*Fontes mitocondriais de ROS.* Dado o ambiente intramitocondrial ser altamente redutor, vários componentes respiratórios, incluindo as flavoproteínas, os centros Fe-S e as semiquinonas, são termodinamicamente capazes de transferir um electrão para o oxigénio. Além disso, mais etapas na cadeia respiratória envolvem reacções com transferência de um único electrão favorecendo, posteriormente, a redução monovalente do oxigénio. Para reagir à formação de ROS, a mitocôndria possui várias defesas antioxidantes destinadas à eliminação tanto do anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) como do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Os valores das concentrações fisiológicas do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$ , no estado de equilíbrio, foram propostos por Cadenas e Davies (2000) em  $10^{-10}M$  e  $5 \times 10^{-9}M$ , respectivamente.

A formação do anião superóxido ocorre na membrana mitocondrial externa, na matriz e em ambos os lados da membrana mitocondrial interna (Figura 15). Enquanto que o  $O_2^{\bullet-}$  gerado na matriz é eliminado nesse compartimento, parte do superóxido produzido no espaço intermembranar pode ser transportado para o citoplasma através de canais de aniões (Han *et al* 2003).



**Figura 15 - Produção mitocondrial e destruição do radical superóxido.** O radical superóxido é formado em reacções do Complexo I e III, conforme o radical ubiquinona cede um electrão ao O<sub>2</sub> produzindo principalmente o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Esta espécie pode reduzir o cit. C (no espaço intermembranar), ou ser convertido em peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigénio (tanto na matriz como no espaço intermembranar) pelas SOD. As reacções que se encontram a azul mostram algumas defesas celulares contra os danos provocados pelo superóxido. (Retirado de Nelson *et al*, 2004).

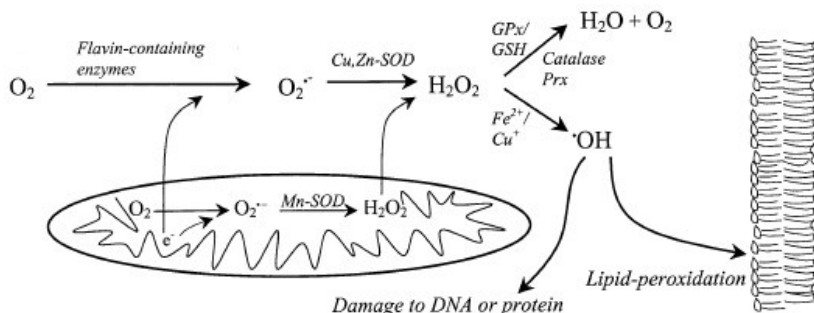
A contribuição relativa de cada parte para a produção total de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> varia de órgão para órgão e depende também do estado de respiração das mitocôndrias (estado 3 – respiração activa, ou estado 4 – cadeia respiratória num estado altamente reduzido). Embora o complexo III pareça ser responsável pela maior parte do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produzido nas mitocôndrias do coração e dos pulmões, a formação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pelo complexo I parece ser a fonte principal de superóxido no cérebro em condições normais. O complexo I foi também descrito como a principal fonte de ROS numa variedade de situações patológicas que vão desde o envelhecimento até à doença de Parkinson (*in* Turrens, 2003; Jezek *et al*, 2005)).

À medida que os electrões percorrem a cadeia respiratória, a energia libertada converte-se num gradiente de H<sup>+</sup> através da MMI sendo utilizado pelo complexo V (ATP sintetase) para a síntese de ATP. Na ausência do ADP, o movimento de H<sup>+</sup> através da ATP sintetase pára e o gradiente de H<sup>+</sup> aumenta provocando a diminuição do fluxo de electrões e a cadeia respiratória fica mais reduzida (estado 4 da respiração). Daqui resulta que a concentração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> livre aumenta. A formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ainda pode aumentar pela presença de certos inibidores (por exemplo, rotenona e antimicina) provocando a redução completa dos transportadores anteriores ao local de inibição.

A formação simultânea do  $O_2^{\bullet-}$  e do óxido nítrico produz a peroxinitrito, um agente oxidante muito poderoso. O óxido nítrico resulta da quebra da arginina em citrulina, numa reacção catalisada por enzimas NADPH-dependentes, designadas óxido nítrico sintetases. A formação de óxido nítrico na mitocôndria pode ter consequências importantes porque este composto se liga a grupos hema dos citocromos (em particular da citocromo oxidase) inibindo a respiração e levando à produção de mais  $O_2^{\bullet-}$ . Este reage com mais óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) formando peroxinitrito, um oxidante capaz de inibir enzimas importantes e de afectar a integridade mitocondrial. Como a formação de  $^{\bullet}NO$  requer oxigénio, a quantidade que é produzida varia com a concentração intramitocondrial de oxigénio.

*Defesas antioxidantes na mitocôndria.* Os efeitos deletérios resultantes da formação de ROS na mitocôndria são, em grande medida, evitados por vários sistemas antioxidantes (figura 16). O superóxido é enzimaticamente convertido em  $H_2O_2$ , por metaloenzimas designadas superóxido dismutases (SOD) (Fridovich, 1995). A matriz mitocondrial contém uma forma específica de SOD, com manganésio no local activo, que elimina o formado na matriz ou no lado matricial da MMI. A expressão da enzima MnSOD é aumentada por agentes que causam stresse oxidativo, incluindo a radiação e a hiperóxia. A concentração de  $O_2^{\bullet-}$  no estado de equilíbrio no espaço intermembranar é controlado por três mecanismos diferentes. Primeiro, neste compartimento existe uma isoenzima SOD diferente que contém cobre e zinco em lugar de manganésio (CuZnSOD), que também existe no citoplasma das células eucarióticas. Em segundo lugar, o espaço intermembranar contém citocromo *c* que pode ser reduzido pelo  $O_2^{\bullet-}$ , regenerando oxigénio neste processo. O cit. *c* assim reduzido pode transferir o electrão para a oxidase terminal. Deste modo, alguns dos electrões que escaparam da cadeia respiratória produzindo  $O_2^{\bullet-}$ , podem reduzir novamente o cit.*c* e contribuir para a produção de energia ao fornecer a energia necessária para bombear  $H^+$  através do complexo IV. Finalmente a dismutação espontânea do  $O_2^{\bullet-}$ , no espaço intermembranar, é facilitada pelo menor pH deste compartimento, resultante da extrusão do  $H^+$  associado à respiração (*in* Turrens, 2003). O peróxido de hidrogénio, resultante da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  e principal precursor do  $^{\bullet}OH$  na presença de metais de transição reduzidos, é na maior parte das vezes, decomposto pela enzima glutational peroxidase. Uma segunda glutational peroxidase está associada à membrana mitocondrial, conhecida como

fosfolípido-hidroperóxido-glutathione peroxidase, envolvida especificamente na redução de peróxidos lipídicos associados às membranas.



**Figura 16 - Esquema simplificado dos sistemas celulares oxidantes e antioxidantes.** O ânion superóxido é produzido intracelularmente em quantidades significativas quer no citosol (por flavoenzimas) quer na mitocôndria (devido à fuga de electrões da cadeia respiratória). O ânion superóxido por ser dismutado, espontaneamente ou através de SOD, originando oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio pode ser enzimaticamente metabolizado em oxigénio e água por diferentes enzimas ou convertido em radical hidroxil, o qual é altamente reactivo, via reacções que envolvam metais de transição. (Retirado de Nordberg *et al*, 2001).

Para além do cit *c*, outro transportador de electrões parece desempenhar um papel desintoxicante contra as ROS mitocondriais. O ubiquinol ( $QH_2$ ) é muitas vezes mencionado como um agente redutor na eliminação de vários peróxidos na presença de succinato. Deste modo, a coenzima Q é uma fonte de  $O_2^{\bullet-}$  quando parcialmente reduzida (forma de semiquinona) e um antioxidante quando completamente reduzida (Beyer, 1990 *in* Turrens, 2003). A membrana mitocondrial interna também contém vitamina E que interfere com a propagação das reacções em cadeia envolvendo radicais livres.

Para além das defesas antioxidantes supra mencionadas, a mitocôndria tem uma variedade de enzimas reparadoras de DNA de forma a corrigir erros resultantes de danos oxidativos. Isto revela-se muito importante porque, embora 95% das proteínas mitocondriais sejam codificadas pelo DNA nuclear, o cromossoma mitocondrial (mtDNA) contém genes que codificam proteínas muito importantes incluindo as sub-unidades da NADH desidrogenase, a citocromo oxidase e o citocromo *b* (*in* Turrens, 2003).

*Envolvimento da mitocôndria na morte celular.* Embora em condições normais haja um equilíbrio entre a formação de ROS e o nível de antioxidantes, em várias situações patológicas as defesas antioxidantes tornam-se insuficientes resultando em stresse oxidativo que conduz muitas vezes à apoptose e morte celular. A apoptose (ou morte celular programada) é um mecanismo usado pelos mamíferos, plantas e outros organismos, para eliminar células redundantes ou danificadas fazendo parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de crescimento de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem causar danos irreversíveis nos organismos. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso. Qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças [16].

A apoptose excessiva está na base de muitas doenças neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson), lesões secundárias após isquemia (bloqueio de circulação do sangue), retinite pigmentosa (uma causa de cegueira) e osteoporose (perda de massa óssea). Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva: na doença de Alzheimer, os neurônios parecem cometer suicídio precocemente, o que resulta em demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória [16].

Já a ausência de apoptose, em que a célula "esquece" de morrer, pode levar a doenças auto-imunes (em que o sistema imune ataca o próprio organismo), infecções víricas prolongadas ou tumores (como no cancro). As doenças auto-imunes podem ser geradas por falhas no programa de morte (ainda no timo) de células T que reagem com substâncias do próprio organismo, ou mesmo após uma reacção de defesa a certos componentes externos muito semelhantes aos internos ([16], *in* Halliwell, 1999).

A apoptose pode ser despoletada por sinais extracelulares (vias extrínsecas) ou por processos intracelulares (vias intrínsecas). Um aumento da formação mitocondrial de ROS despoleta a via intrínseca ao aumentar a permeabilidade da MME através da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial. Como resultado deste processo, o cit. *c* passa do espaço intermembranar para o citoplasma da célula onde se junta com outro factor apoptótico (Apaf-1). Na presença de ATP este complexo polimeriza num oligómero conhecido como “apoptossoma”. O apoptossoma activa uma protease (caspase-9), que por sua vez activa a caspase-3. A cascata de reacções proteolíticas mediadas pelas caspases activa, por sua vez, as DNases e, no final, o

processo resulta na morte celular. Em condições normais, vários factores anti-apópticos (incluindo Bcl-xL) impedem a alteração da permeabilidade mitocondrial enquanto permanecerem ligadas à membrana externa. Este factor é eliminado quando outro factor, Bax, é transferido para a mitocôndria, iniciando-se a apoptose (Turrens, 2003).

A perda gradual do cit. *c* do espaço intermembranar durante a apoptose favorece a formação mitocondrial de  $O_2^{\bullet-}$  de duas formas: por um lado, o cit.*c* é um agente complexante do  $O_2^{\bullet-}$ ; por outro lado, como o cit. *c* é libertado, a cadeia respiratória fica num estado mais reduzido porque o fluxo de electrões entre o complexo III e o complexo IV diminui (Turrens, 2003).

Também vários xenobióticos interagem com a cadeia transportadora de electrões mitocondrial, aumentando a produção de  $O_2^{\bullet-}$  através de dois mecanismos diferentes. Alguns destes compostos estimulam o stresse oxidativo porque bloqueiam o transporte de electrões, aumentando o estado de redução dos transportadores localizados antes do local de inibição. Outros xenobióticos podem aceitar um electrão de um transportador respiratório e transferi-lo para o oxigénio molecular, estimulando a formação de  $O_2^{\bullet-}$  sem inibir a cadeia respiratória. Actualmente aceita-se que a doença de Parkinson possa resultar da exposição a concentrações sub-letais de inibidores do complexo I, estimulando a formação de  $O_2^{\bullet-}$  e levando as células à apoptose. O stresse pode também resultar de deficiências nas defesas antioxidantes. Tanto os factores genéticos como os de envelhecimento podem causar um aumento da concentração de equilíbrio de ROS mitocondrial (Turrens, 2003).

A formação de SOD mitocondrial está dependente de DNA nuclear sendo necessário que a enzima seja transportada para a matriz onde adquire a forma activa. A eficiência do transporte do MnSOD depende de um polipeptídeo sinalizador que o condiciona. A alteração num aminoácido deste polipeptídeo vai alterar a sua estrutura terciária e interferir com o transporte de MnSOD para a matriz, resultando numa diminuição da actividade desta enzima em cerca de 40% no referido compartimento. Há referências na literatura relacionando esta mutação com uma incidência crescente da doença de Parkinson, salientando a correlação entre esta doença e o stresse oxidativo (Turrens, 2003).

A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é outra doença neurológica que tem sido associada ao stresse oxidativo, associando-o com uma mutação no gene que codifica a CuZn SOD. Esta mutação parece provocar uma falta de flexibilidade, impedindo a

passagem desta enzima para o espaço intermembranar, aumentando a concentração de  $O_2^{\bullet}$  e levando à apoptose (Turrens, 2003).

O processo de envelhecimento tem sido também associado com deficiências no sistema de reparação do DNA mitocondrial. O DNA mitocondrial não contém histonas, e, portanto, está menos protegido contra o stresse oxidativo do que o DNA nuclear. O síndrome de Cockayne provoca o envelhecimento prematuro e tem sido relacionada com uma deficiência na enzima mitocondrial requerida para reparar o DNA (Turrens, 2003).

As diferenças relacionadas com o sexo no tempo de vida entre várias espécies, com as fêmeas a viverem mais que os machos, também se relacionam com as diferenças nas defesas antioxidantes. Esta diferença parece estar relacionada com a produção de estrogéneos, uma vez que não se verifica em fêmeas que sofreram uma remoção dos ovários e poderá estar associada a um aumento da concentração mitocondrial de glutathione e da actividade da glutathione peroxidase (Turrens, 2003).

Pretendeu-se com esta componente do trabalho adequar protocolos experimentais que, de um modo global, permitem abordar “os efeitos do oxigénio no mundo vivo: dos extraordinários melhoramentos aos efeitos deletérios”. Assim, para além de um objectivo geral de actualização de conhecimentos, são objectivos específicos desta componente da dissertação:

1. A compreensão do processo de respiração celular e a avaliação do estado oxidativo dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de electrões, localizados na membrana mitocondrial interna, utilizando um homogeneizado de fígado e um indicador de oxi-redução (DPIP). Neste âmbito pretende-se pôr em prática um protocolo relativamente simples (actividade I) que poderá ser abordado ao nível do 12º ano e potenciado, sob a forma de projecto, permitindo que os alunos apliquem conhecimentos de diferentes disciplinas. O relacionamento da actividade mitocondrial com a manifestação de disfunções, como o envelhecimento e a morte celular programada, irá permitir a exploração de outros conceitos cada vez mais divulgados (espécies reactivas de oxigénio e stresse oxidativo).
2. A avaliação da influência de parâmetros físicos (temperatura) e químicos (concentração do substrato, concentração da enzima, pH e presença de inibidores) na actividade enzimática da catalase, uma enzima de defesa anti-oxidante. Para isso serão



usados dois protocolos diferentes adaptados a diferentes níveis de conhecimento: actividade II para o 9º, 10º ou 11º anos e actividade III para o 12º ano. Esta última actividade permitirá, ainda, implementar experiências de cinética enzimática com determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  através da linearização de curvas de saturação e delas deduzir o tipo de inibição (competitiva ou não competitiva) provocada por um agente inibidor.

## **MATERIAL E MÉTODOS**



## **Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES**

### ***Material Biológico***

Foi utilizado um homogeneizado de fígado de rato (macho, aproximadamente de 4 semanas, da raça Wistar e adquirido à Charles River-Espanha). O fígado foi retirado após morte do animal, por deslocamento cervical, seguido de decapitação. Foi mantido numa tina com meio de homogeneização e em gelo onde se procedeu a uma lavagem para remoção do sangue. Foram retiradas zonas de gordura e partido em pequenas porções (2 a 5 mm). Depois de lavado com meio isotónico e liberto de tecido adiposo, pesaram-se 16gr que foram transferidos para o copo de um homogeneizador do tipo Waring-Blender. Procedeu-se à homogeneização com 200ml de meio isosmótico frio (3 x 15seg na velocidade 4 num máximo de 7). O homogeneizado, num volume final de 250 ml, foi filtrado por 3 camadas de gaze e mantido em gelo durante o procedimento experimental. Alíquotas deste homogeneizado foram mantidas a 0°C para utilização imediata ou rapidamente congeladas para posterior utilização.

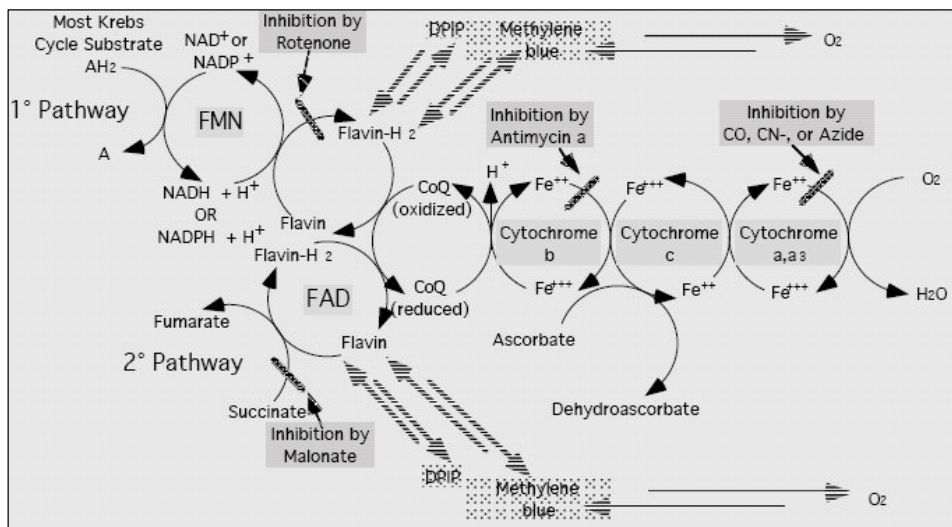
### ***Reagentes químicos***

A sacarose usada foi açúcar comercial normal. O cloreto de potássio (KCl), o ácido succínico ( $\text{NaOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COONa} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), o DPIP 2,6-diclorofenolindofenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_2\text{NO}_6\text{N}$ ), o  $\text{NAD}^+$  nicotinamida adenina dinucleótido na forma oxidada ( $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$ ), a rotenona ( $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ), o malato ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ ), o  $\beta$ -hidroxibutirato sal sódico ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{Na}$ ) e o malonato ( $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ ) foram adquiridos à Sigma. O cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), o hidrogenofosfato di-potássico tri-hidratado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), o di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), o ácido láctico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ) e o piruvato sal sódico ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3\text{Na}$ ) são da Merck. O cianeto de potássio (KCN) foi adquirido à Aldrich. Todas as soluções preparadas são aquosas excepto a rotenona que é uma solução alcoólica. Algumas informações sobre a preparação das soluções são fornecidas no anexo B.

### ***Procedimento***

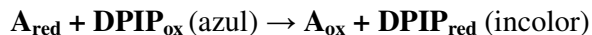
Foram testados diferentes substratos respiratórios (glicose, lactato, succinato, piruvato,  $\beta$ -hidroxibutirato e malato) e diferentes inibidores (rotenona e malonato,

inibidores competitivos da cadeia de transporte de electrões, e cianeto de potássio inibidor não competitivo da mesma). Na figura 17 encontra-se esquematizada a Cadeia de Transporte de Electrões (CTE) com indicação dois locais de entrada dos substratos e locais de acção dos inibidores.

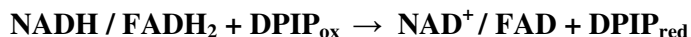


**Figura 17 - Esquema dos locais de entrada dos substratos e locais de acção dos inibidores.**  
Retirado de [17]

O 2,6-diclorofenol-indofenol (DPIP) é um indicador de oxi-redução não auto-oxidável que aceita electrões de flavoproteínas ( $\text{FADH}_2$  e  $\text{FMNH}_2$ ) e nicotinamidas ( $\text{NADH}$ ) reduzidas passando da forma oxidada (azul) à forma reduzida (incolor). Deste modo, a redução do DPIP e consequente perda de cor pode ser usada para avaliar oxidações biológicas ([18]; Clark *et al*, 1977).



A reacção química envolvida é baseada na redução do DPIP pelo  $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$  ou  $\text{FMNH}_2$  (Ottosson *et al*, 2004; [19]).



A aceitação de protões por parte do DPIP vai provocar a sua redução e consequente perda de cor. No entanto, também pode ceder electrões retomando a cor azul, pelo que se verificou a necessidade de bloquear a CTE no citocromo oxidase de

forma a que os electrões não possam chegar ao oxigénio e, desta maneira, impedir a descoloração do DPIP ao fim de um tempo mais ou menos rápido.

O método de determinação utilizado foi a espectrofotometria. Foi seleccionado o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 600nm e usado como branco tampão fosfato 50mM. Para cada situação experimental criada foram feitas leituras contínuas durante 5 minutos (300 seg.) com registo da absorvância de 30 em 30 segundos. Todas as reacções decorreram à temperatura ambiente tendo-se mantido em gelo o homogeneizado e o  $\text{NAD}^+$ .

Em todos os testes realizados foram feitos brancos: o *branco 1* consiste em 2ml de tampão fosfato com 1 ml de homogeneizado; o *branco 2* é constituído por 1,5 ml de tampão fosfato 50 mM, 0,5 ml de DPIP 1 mM e 1 ml de homogeneizado. Todos os tubos tinham um volume final de 3 ml. Os valores obtidos no primeiro branco são subtraídos aos valores dos restantes tubos anulando-se deste modo a influência da turvação do homogeneizado. O branco 2 permite avaliar o efeito dos substratos endógenos na redução do DPIP e serve de termo de comparação com as restantes curvas.

Para avaliar a importância do  $\text{NAD}^+$  no processo de respiração celular foram usados três substratos a: Glicose, o Lactato e o Succinato. Para tal foram preparados 6 tubos: numa série de três tubos com 1 ml de tampão fosfato foi colocado 0,5 ml de substrato numa concentração no volume final de 7,5 mM para a glicose e succinato e de 15mM para o lactato; a estes tubos foi adicionado 0,5 ml de DPIP (0,1667mM no tubo) e 1 ml de homogeneizado. Outra série de três tubos foi preparada com os mesmos substratos mas a quantidade de tampão fosfato 50 mM foi de 0,4 ml tendo-se adicionado, para além do corante e homogeneizado, 0,6 ml de  $\text{NAD}^+$  (concentração no tubo de 1 mM). Após a adição do homogeneizado, no momento de iniciar a reacção, o conteúdo do tubo foi vertido para uma cuvete procedendo-se à leitura em espectrofotómetro da variação da coloração do DPIP ao longo de 5 min por períodos de 30 segundos.

O efeito do KCN nas reacções do metabolismo oxidativo foi testado para os três substratos atrás referidos e nas seguintes condições: nos tubos com a glicose e o lactato foi também adicionado  $\text{NAD}^+$  enquanto que no tubo com succinato não; em todos os

tubos foi adicionado 10 µl de KCN numa concentração no tubo de 1 µM. Adicionou-se 1 ml de homogeneizado para iniciar a reacção e procedeu-se à leitura em espectrofotómetro do modo já foi descrito.

Foram também testados outros inibidores específicos da cadeia transportadora de electrões: rotenona e malonato, ambos inibidores competitivos. Foram preparados tubos, um com glicose, outro com lactato e outro com succinato, aos quais foi adicionado  $\text{NAD}^+$  e DPIP nas concentrações já referidas e 10 µl de rotenona (5 µM no tubo). De igual modo foram preparados outros dois tubos mas onde o substrato foi o succinato (um tubo com 0,5 ml de succinato 45 mM e outro com 0,5 ml de succinato 150 mM) e onde o inibidor usado foi o malonato (45 µl de malonato a 0,2 mM). A reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado e o procedimento de leitura dos resultados foi igual ao atrás descrito.

Ainda se testou a possibilidade de usar outro tipo de substratos do ciclo do ácido cítrico. Os substratos seleccionados foram: piruvato, malato e  $\beta$ -hidroxibutirato. Foram preparados três tubos da seguinte forma: 1 ml de tampão fosfato 50mM, 0,5 ml de um dos substratos (piruvato 4 mM, malato 10 mM e  $\beta$ -hidroxibutirato 10 mM) e 0,5 ml de DPIP 1,5 mM num volume de 2 ml. A reacção foi iniciada com a adição de 1ml de homogeneizado. A acção do KCN e da rotenona sobre estes substratos foi também testada de modo idêntico ao descrito anteriormente para os primeiros substratos usados.

## **Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE**

### ***Material Biológico***

A enzima em estudo é a catalase que se encontra presente em muitos tecidos, nomeadamente na batata e no fígado. A batata foi escolhida como fonte de catalase devido ao facto de ser rica nesta enzima e ser um material biológico de fácil aquisição.

Foram usadas batatas novas e batatas geladas. Algumas batatas novas foram submersas em água durante 24 horas provocando uma situação de stresse por anoxia. Estas três situações deram origem a três lotes que foram testados: o lote de batata dormente (cujo material biológico era batata nova), o lote de batata gelada e o lote de

batata submersa. Após serem lavadas e descascadas foram partidas em pequenos cubos (~0.5cm) e pesada uma porção de cerca de 50gr. A porção pesada foi colocada num copo de homogeneização juntamente com água desionizada fria até cobrir as hélices (~200ml). A homogeneização foi feita durante dois períodos de 15seg filtrando-se, de seguida, o homogeneizado de batata através de quatro camadas de gaze; lavou-se o copo com a restante água desionizada fria (num volume total de 250ml) e verteu-se sobre o filtro. A partir do momento em que o extracto é homogeneizado, e ao longo da experiência, foi sempre mantido em gelo. Este extracto foi marcado arbitrariamente como contendo 100 unidades de enzima por ml (100U/ml). Antes de cada utilização o homogeneizado foi bem agitado (por inversão).

### ***Reagentes químicos***

Foram usados como reagentes peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 30% da Merck, metilhidroxilamina hidrocloreto ( $CH_3ONH_2.HCl$ ) da Fluka e discos de fibra de vidro da Whatman de 24mm de diâmetro. O tampão fosfato foi preparado com dihidrogenofosfato de potássio ( $KH_2PO_4$ ) da Merck usando-se KOH 3M ou HCL 1M para acerto do pH. Todas as soluções aquosas foram feitas com água desionizada. Algumas informações sobre a preparação das soluções são fornecidas no anexo E.

### ***Procedimento***

A metodologia desenvolvida baseou-se num protocolo usado na Universidade de Princeton [20] tendo sido feitas algumas modificações.

#### ***A. Efeito da concentração da enzima***

A partir do homogeneizado de batata, preparado na altura conforme acima descrito, foram preparadas 6 diluições correspondentes a 6 concentrações do extracto enzimático: 100, 75, 50, 25 e 0 U/ml. Foram colocados 40ml de peróxido de hidrogénio a 1% em diferentes copos de vidro e mantidos à temperatura ambiente. Os discos de fibra de vidro foram encharcados com 250µl de extracto de batata, de cada concentração, e deixados cair no fundo de cada copo. A velocidade da reacção foi tomada pelo inverso do tempo medido desde que o disco caiu no copo, foi até ao fundo e voltou à superfície.



#### *B. Efeito da concentração do substrato*

Foram preparadas 10 concentrações de peróxido de hidrogénio (0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 3, 5, 7 e 10 %) à temperatura ambiente. Foram utilizados copos com 40ml de peróxido de hidrogénio de cada uma das concentrações. Em cada um foi deixado cair um disco encharcado com 250µl de extracto enzimático 100U/ml e medida a taxa de reacção pelo inverso do tempo medido, conforme anteriormente descrito.

#### *C. Efeito de um inibidor (metilhidroxilamina) na actividade enzimática*

Neste caso, o extracto de batata (1ml) foi incubado com 50µl de metilhidroxilamina a 10% durante um 1 min à temperatura ambiente. Como substrato foi utilizado  $H_2O_2$  a 1%. Foram feitos dois brancos: um sem inibidor e com enzima e outro sem enzima e com inibidor. Tal como anteriormente, foi medido o tempo desde que o disco mergulha na solução de  $H_2O_2$  até que volta à superfície sendo a actividade da enzima expressa como o inverso desse tempo.

#### *D. Influência da temperatura e do pH*

Foram colocados copos com 40ml de  $H_2O_2$  a 1% às temperaturas pretendidas (0, 10, 20 ou ambiente, 32 e 37 e 45°C). Ao mesmo tempo colocaram-se 6 tubos com 5ml de extracto de batata às mesmas temperaturas para que a temperatura estivesse nas mesmas condições do substrato. Depois de estabilizada a temperatura, nos valores pretendidos, encharcaram-se os discos com 250 µl de extracto de batata igual à temperatura desejada, que depois foram colocados nos copos. A velocidade de reacção foi determinada como anteriormente.

As diferentes condições de pH foram criadas usando tampão tampão fosfato 50mM acertado respectivamente com KOH 3M ou HCl 1M. A 3ml de solução tampão, com determinado pH, foi adicionado 1 ml de extracto enzimático 100U/ml. Como controlo foi utilizado água desionizada em vez de solução tampão. Em goblés com 40ml de  $H_2O_2$  a 1%, à temperatura ambiente, foram deixados cair discos encharcados com extracto de batata ao valor de pH pretendido. A actividade enzimática foi avaliada, como anteriormente, através do inverso do tempo necessário ao regresso à superfície dos discos encharcados com extracto de batata aos diferentes pHs.

### *E. Influência de situações de stress*

Foi colocada uma batata em situação de anoxia (por submersão em água) durante 24 horas tendo-se procedido à sua homogeneização do modo já descrito. Fez-se cair num goblé com 40 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1%, à temperatura ambiente, um disco encharcado com extracto de batata não submetida a anoxia e noutro goblé nas mesmas condições, um disco encharcado com extracto de batata que esteve submersa. Tal como atrás descrito, o inverso do tempo que o disco demora a descer e voltar à superfície permite avaliar a actividade da enzima.

## **Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA**

### ***Material Biológico***

Foi utilizada catalase de fígado de bovino, adquirida à Sigma, contendo 1.870U/mg de matéria sólida e 2,310U/mg de proteína. Foi preparada uma solução stock a 0,4mg/ml com tampão fosfato pH 7.0 frio sendo depois diluída 10 vezes com o mesmo tampão (concentração da solução de trabalho de 0,04mg/ml). A solução stock foi mantida congelada a 0°C. A solução de trabalho foi mantida sempre no gelo durante a realização da actividade.

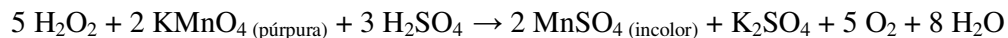
### ***Reagentes químicos***

O peróxido de hidrogénio a 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), o ácido ftálico ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{H})_2$ ) e o di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram adquiridos na Merck. O ácido sulfúrico a 96% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) era da Panreac. O permanganado de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) usado era da M&B. O cianeto de potássio ( $\text{KCN}$ ) e o Trizma Base eram da Aldrich. Todas as soluções preparadas são aquosas; o peróxido de hidrogénio é preparado em tampão fosfato 10mM. Algumas informações sobre a preparação das soluções são fornecidas no anexo B.

### ***Procedimento***

A avaliação da actividade da catalase foi feita determinando a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não decomposto pela enzima. A reacção enzimática é interrompida através da adição de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). O  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diminui o pH, desnaturando a enzima e

interrompendo a sua actividade catalítica. Após a paragem da reacção, a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente (que não foi degradada pela enzima) é medida através da titulação com permanganato de potássio, segundo a reacção seguinte:



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o reagente desta reacção. Quando mais  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagir, mais  $\text{KMnO}_4$  será necessário usar na titulação. A adição de  $\text{KMnO}_4$  em excesso leva a que se desenvolva uma coloração rosa na solução. Portanto, a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente é determinada pela quantidade de  $\text{KMnO}_4$  adicionada até a solução ficar, permanentemente, de cor rosa clara, o que indica o fim da titulação. A quantidade de  $\text{KMnO}_4$  adicionada é uma medida proporcional da quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente (segundo a reacção apresentada, 2 moléculas de  $\text{KMnO}_4$  reagem com 5 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). No Anexo A são fornecidos alguns dados para a determinação do teor de peróxido de hidrogénio destruído.

A actividade da catalase foi determinada por titulação, com permanganato de potássio 0.05M, da quantidade de peróxido de hidrogénio 0.1M remanescente, após a actuação da enzima. A reacção foi parada aos 5min com 10ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Todas as experiências decorreram à temperatura ambiente à excepção das efectuadas para avaliar o efeito da temperatura. A actividade da enzima foi expressa em mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  destruído em cada caso.

Para avaliar o efeito da concentração da enzima foram preparadas várias concentrações da mesma (0, 0.01, 0.02, 0.03 e 0.04mg) a partir da solução de trabalho de catalase (0.04mg/ml). A reacção fez-se decorrer em copos de vidro contendo 10ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M em tampão fosfato 10mM. A reacção foi parada após 5 min, pela adição de 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M. De seguida procedeu-se à titulação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente com permanganato de potássio conforme acima referido.

A actividade da enzima ao longo do tempo foi determinada através da adição de 1ml de catalase 0.04mg/ml em goblés com 10ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M. A reacção foi interrompida aos 0, 1, 3, 5 e 10 min de tempo após o seu início. Procedeu-se à titulação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente em cada caso.

Para determinar o efeito da temperatura foram colocados goblés com 10ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M a diferentes temperaturas (0, 10, 25 ou ambiente, 37 e 45°C). Foi adicionado 1ml de catalase 0.04mg/ml previamente colocada à mesma temperatura. Para cada temperatura foi feito um controlo sem enzima. A reacção foi parada aos 5min e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  destruído foi determinado após titulação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente.

Par testar o efeito do pH foram preparadas soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M em soluções tampão 50mM a pH 3 (tampão citrato), 5 (tampão ftalato), 7 (tampão fosfato) e 9 (tampão Tris). Foi adicionado 1ml de catalase 0.04mg/ml e a reacção foi parada após 5min. A quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  destruído foi determinada após titulação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente.

A concentração do substrato também influencia a actividade enzimática. Foram usadas várias concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1, 0.75, 0.5 e 0.25 mM num volume de 10ml). A reacção foi iniciada pela adição de 1ml de catalase 0.04mg/ml. Para cada concentração foi feito um branco sem enzima. Após 5 min a reacção foi parada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M, tendo-se procedido à titulação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente. Os dados obtidos pela avaliação do efeito da concentração do substrato foram introduzidos em software (GraphPadPrism4) o que permitiu obter o valor de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  e proceder à linearização de Lineweaver-Burk, .

Adicionalmente foi determinada a percentagem de inibição causada pelo cianeto na actividade da catalase. Neste caso foram usados 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M na presença de 1 $\mu\text{M}$  e 0.1 $\mu\text{M}$  de KCN e 1ml de enzima 0.04mg/ml. A reacção foi parada após 5 min tendo-se determinado a % de actividade da enzima e a % de inibição provocada pelo inibidor. Os resultados obtidos foram introduzidos no GraphPadPrism4 obtendo-se os respectivos  $K_M$ ,  $V_{\text{máx}}$  e curvas de linearização de Lineweaver-Burk. Estes dados permitiram obter o efeito do inibidor na cinética enzimática da catalase e determinar o tipo de inibição exercida pelo KCN em relação à catalase.



## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

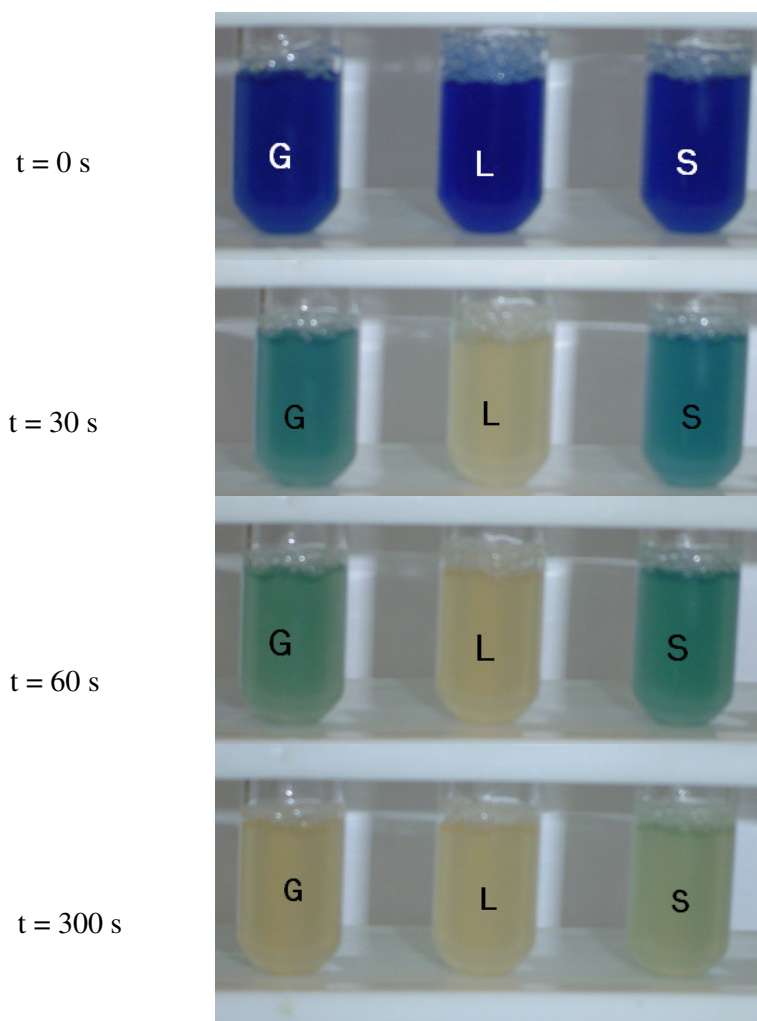


### **Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES**

Para o estudo do estado de oxidação-redução dos complexos respiratórios foi utilizado um protocolo baseado numa técnica colorimétrica o que implicava a utilização de um aceitador de electrões (DPIP) que muda de cor conforme o seu estado de oxidação-redução.

Numa primeira abordagem a avaliação da descoloração do DPIP, induzida nas diferentes condições ambientais testadas, foi feita de uma forma qualitativa ao fim de 5 minutos o que levantou alguns problemas de interpretação dos resultados. Nalgumas situações a redução era muito rápida e, noutros casos, era lenta sendo difícil qualificar o grau de descoloração que era atingido, isto é, a velocidade a que ocorria a descoloração não era tida em consideração. Na figura 18 apresenta-se um exemplo dos resultados inicialmente obtidos tendo-se usado glicose, lactato e succinato como substratos. Apresentam-se fotografias dos resultados obtidos nos momentos  $t=0$  segundo (situação inicial),  $t=30$  segundos,  $t=60$  segundos e  $t=300$ s. Como se pode observar ao fim de 30s já se nota a descoloração do lactato enquanto que a descoloração da glicose e do succinato só se torna evidente ao fim de 60s. Por outro lado, no momento  $t=60$  segundos já houve descoloração da glicose e do succinato mas o grau de descoloração é diferente nos dois tubos sendo difícil quantificar essa diferença. Ao fim de 300 segundos (5 min) verifica-se que todos os tubos descoraram. No entanto, o modo como essa descoloração decorreu foi diferente ao longo do tempo. A utilização da espectrofotometria veio permitir ultrapassar as dificuldades atrás levantadas, quantificar a velocidade de descoloração assim como diferenciar entre descolorações próximas mas não iguais. Assim a velocidade de descoloração o DPIP em cada situação experimental vem expressa como o decréscimo da densidade óptica (D.O.), medida a 600nm, ao longo do tempo. No Anexo D apresentam-se algumas informações sobre a técnica de espectrofotometria.



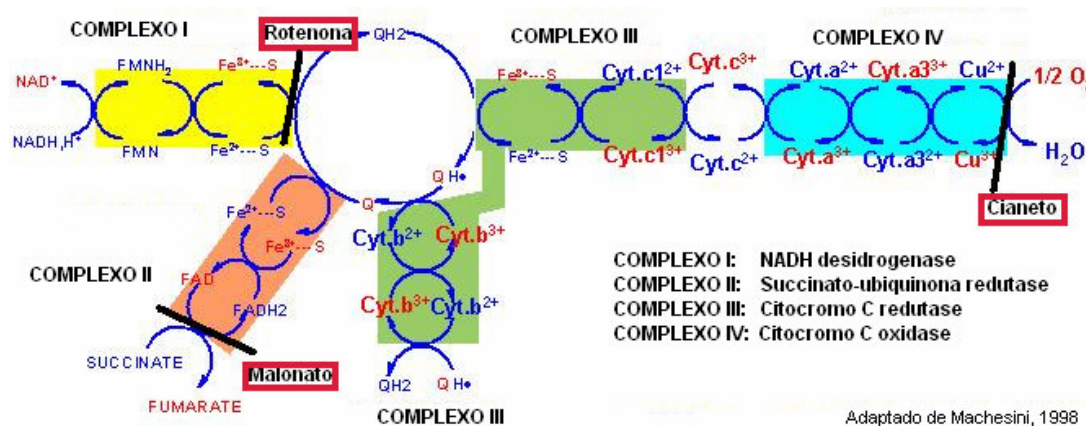


**Figura 18 - Descoloração do DPIP em tubo de ensaio.** Reacção colorimétrica em tubo de ensaio usando DPIP 0.1667mM como aceitador de electrões cedidos pelos diferentes substratos (G – Glicose 7,5M , L – Lactato 15mM e S – Succinato 7,5mM). A concentração dos restantes reagentes no volume final de 3ml foi de  $\text{NAD}^+$  1mM, KCN 1mM e de 1ml de homogeneizado. A reacção decorreu durante 5min (300s).

A metodologia que se passou a seguir tira partido da espectrofotometria de absorção permitindo medir a variação da absorvância durante determinado período de tempo, neste caso a 600nm (Clark *et al*, 1977; [19, 21]). Os substratos usados foram: glicose (G), lactato (L), succinato (S), piruvato (P), malato (M) e  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -H). A glicose e o lactato são substratos das reacções citosólicas (glicólise e fermentação láctica, respectivamente). Os restantes substratos têm que entrar na mitocôndria para poder decorrer a reacção de oxidação. A possibilidade de utilizar os substratos referidos deve-se ao facto de se ter usado homogeneizado de fígado onde encontraríamos as

enzimas citosólicas e mitocôndrias intactas o que permitiu uma abordagem mais alargada do metabolismo energético.

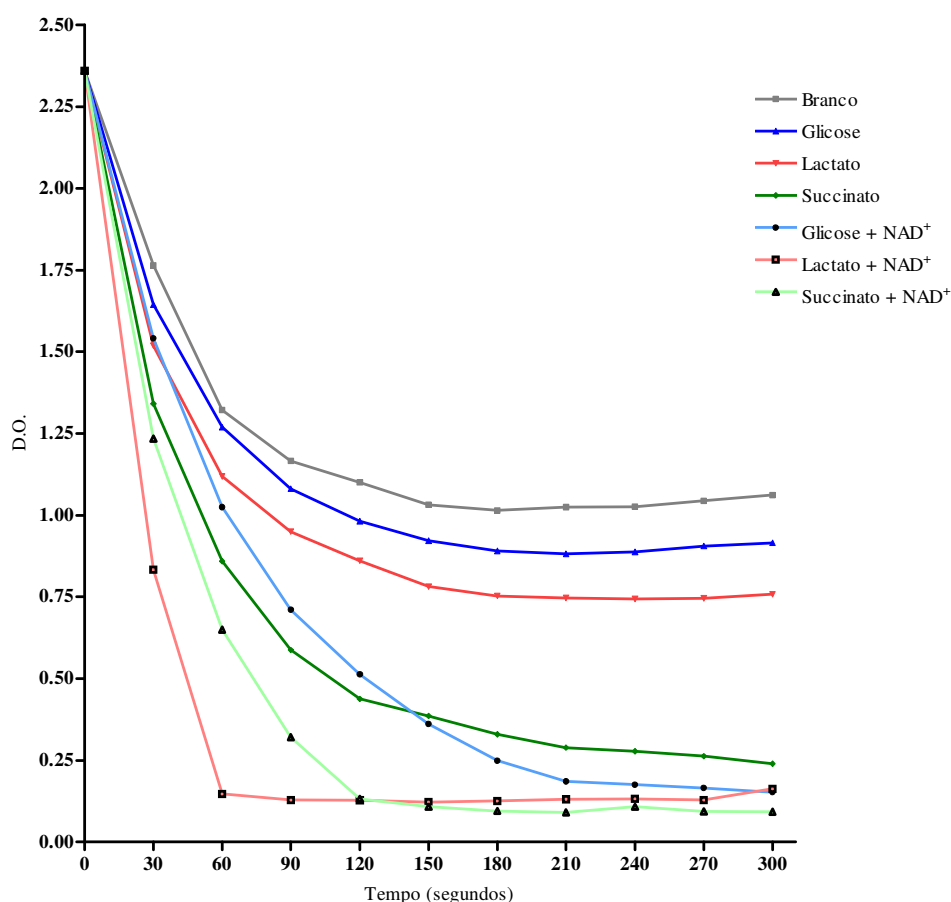
Foram também testados três inibidores (figura 19): a rotenona, um inibidor competitivo que vai impedir a oxidação do NADH pelo Complexo I; o malonato, inibidor competitivo do succinato, impedindo a sua oxidação a fumarato pelo complexo II; e cianeto de potássio, um inibidor que actua ao nível do complexo IV impedindo a passagem dos electrões para o oxigénio [22].



**Figura 19 - Diagrama do fluxo de electrões desde o NADH ou do Succinato até ao oxigénio ( $O_2$ ) na cadeia de transporte de electrões mitocondrial.** O complexo I contém FMN e 22-24 proteínas ferro-enxofre (Fe-S) em 5-7 centros. O complexo II contém FAD, 7-8 proteínas Fe-S em 3 centros e citocromo  $b_{560}$ . O complexo III contém citocromo  $b$ , citocromo  $c1$  e uma proteína Fe-S. O complexo IV contém citocromo  $a$ , citocromo  $a3$  e dois iões cobre. Na figura estão ainda indicados os locais de acção dos inibidores utilizados (barras pretas) e os respectivos nomes (caixa a vermelho). Retirado e adaptado de [23].

Foram realizadas três determinações independentes feitas a partir do mesmo homogeneizado (que no primeiro dia foi utilizado fresco e para posteriores determinações foi congelado). Embora o homogeneizado obtido tenha sido agitado antes de ser distribuído por tubos Falcon para congelar, é provável que a distribuição de organelos, entre os quais as mitocôndrias, bem como dos substratos endógenos e enzimas não tenha sido exactamente a mesma o que se reflectiu em algumas variações nos valores dos dados obtidos. Apesar dessas variações, observa-se o mesmo tipo de tendência nas curvas. A variabilidade verificada de experiência para experiência fez com que se tenha optado por seleccionar um registo representativo relativamente ao conjunto de dados obtidos.

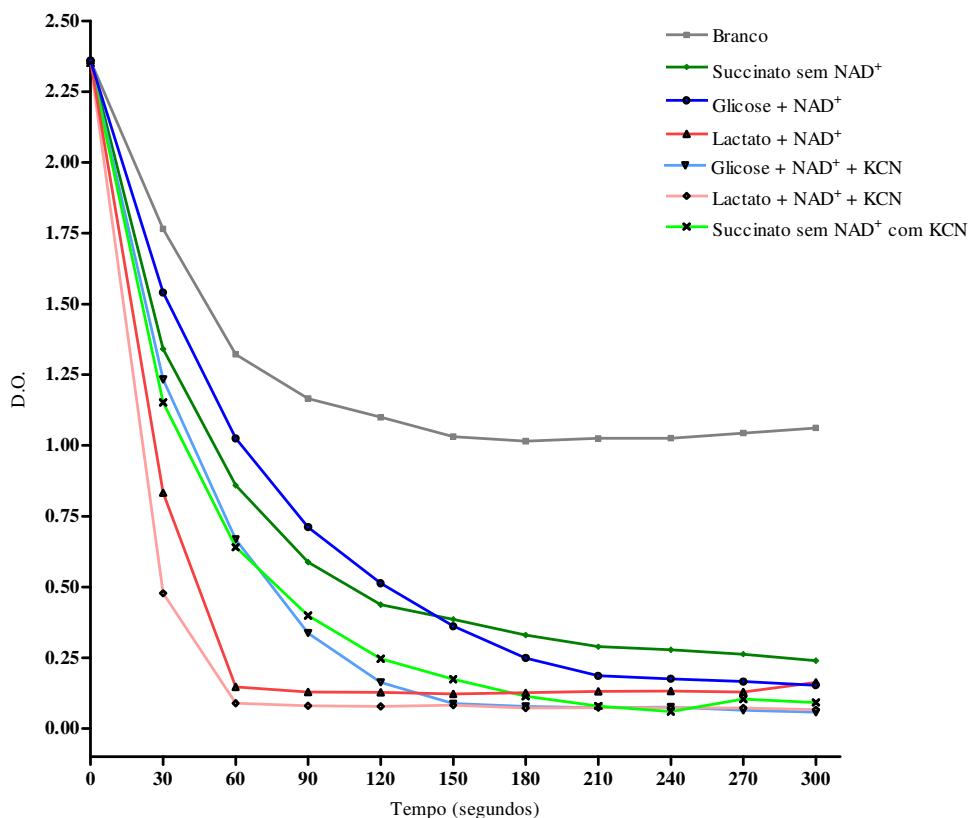
Da análise da figura 20 verifica-se que a glicose e o lactato só são oxidados na presença de  $\text{NAD}^+$ . As curvas dos substratos (glicose e lactato) sem  $\text{NAD}^+$  estão muito próximas do Branco indicando que não houve praticamente redução do DPIP, enquanto que na presença de  $\text{NAD}^+$  as curvas têm um maior declive terminando aos 5 minutos com uma D.O. de 0.153 para a glicose e 0.163 para o lactato (sem coloração). Verifica-se ainda que, na presença de  $\text{NAD}^+$ , a redução do DPIP pelo lactato é muito mais rápida do que a da glicose. A lactato desidrogenase dos mamíferos é uma desidrogenase com  $\text{NAD}^+$  como cofactor e que catalisa a conversão de L-lactato em piruvato [24].



**Figura 20 - Efeito do  $\text{NAD}^+$  na oxidação da Glicose, Lactato e Succinato.** Numa série de 3 tubos foram adicionados 0,5ml de cada substrato e 0,5 ml de DPIP 1mM perfazendo-se um volume de 2ml com tampão fosfato 50mM. Noutros 3 tubos, foram repetidas as condições descritas mas na presença de 0,6ml de  $\text{NAD}^+$  5mM. A reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado. A concentração dos substratos no volume final foi: Glicose e Succinato 7,5 mM, Lactato 15 mM. O branco era constituído por 0,5ml de DPIP 1mM, 1 ml de homogeneizado e tampão fosfato 50mM num volume final de 3ml. A leitura foi feita num espectrofotómetro ( $\lambda=600\text{nm}$ ) ao longo de 300 segundos.

A adição de lactato e  $\text{NAD}^+$  ao homogeneizado favorece a reacção no sentido L-lactato  $\rightarrow$  piruvato provocando a oxidação do lactato e a passagem dos electrões do NADH para o DPIP, de acordo com o descrito na literatura [19, 25]. Por outro lado, a glicose para ser reduzida tem que sofrer primeiro uma fosforilação, com gasto de ATP, sendo um processo mais longo e que decorre mais lentamente. A oxidação do succinato pela flavoproteína do complexo II não necessita da intervenção de  $\text{NAD}^+$  o que se pode verificar pela respectiva curva que atinge uma D.O. final de 0,240 (fica praticamente incolor). No entanto, embora não intervenha na reacção, a presença de  $\text{NAD}^+$  com o succinato provoca uma descoloração um pouco mais acentuada do DPIP o que poderá dever-se à presença de substratos endógenos que o utilizem e, deste modo, aceleram a redução.

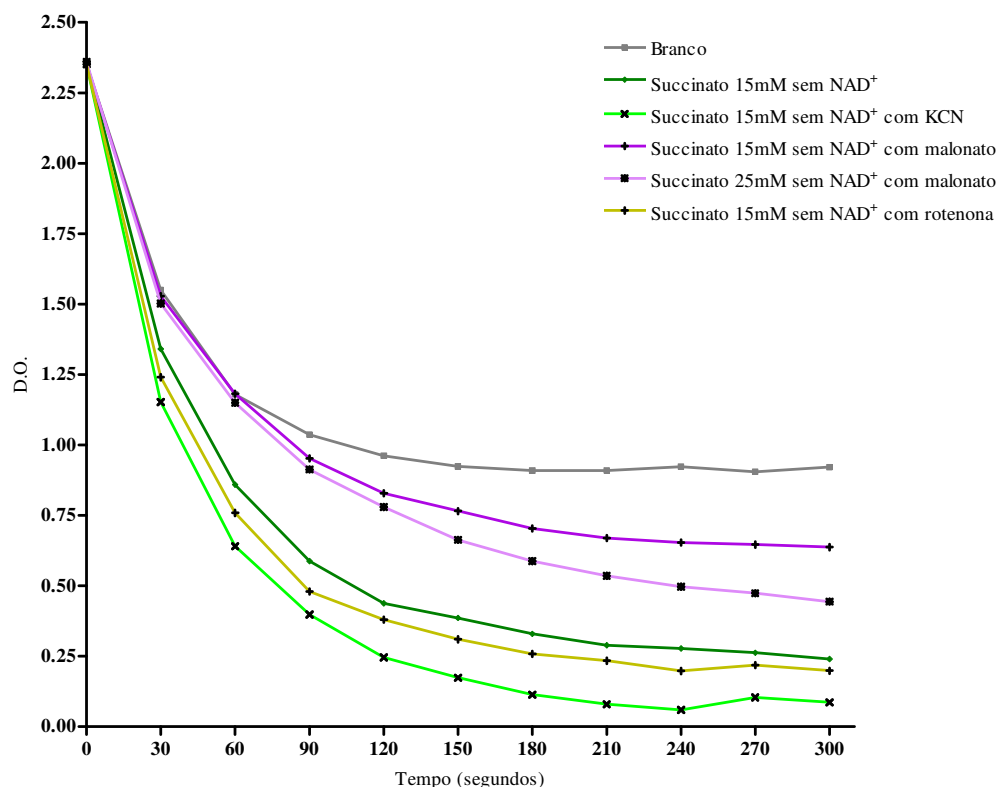
Comparando a velocidade de descoloração do DPIP, nas diferentes condições experimentais representadas na figura 21 verifica-se que a redução do DPIP é mais rápida na presença de KCN quer para os substratos que cedem os electrões ao complexo I (a glicose e o lactato via “shuttle” do malato-aspartato) quer para os que cedem electrões ao complexo II (o succinato directamente e a glicose e o lactato via “shuttle” do glicerofosfato) uma vez que o bloqueio da cadeia respiratória é no complexo IV.



**Figura 21 – Efeito do KCN sobre a Glicose, Lactato e Succinato.** Numa série de 3 tubos fez-se reagir substrato, DPIP 0.167mM e  $\text{NAD}^+$  1mM (nos tubos com glicose e lactato como substrato). Noutra série tubos procedeu-se de igual forma usando-se 30 $\mu$ l KCN 100mM como inibidor. O volume de 2ml foi completado com tampão fosfato 50mM. A reacção foi iniciada com a adição de 1ml de homogeneizado. A concentração dos substratos no volume final de 3 ml foi: Glicose e Succinato 7,5mM, Lactato 15 mM. A evolução da descoloração foi seguida por leitura ao espectrofotómetro ( $\lambda=600\text{nm}$ ) ao longo de 300 segundos.

A reacção com o DPIP é reversível, conforme se mostra na figura 16 e, na verdade verificou-se que nalguns casos havia um retorno do tom azul do DPIP, indicando que este volta a ceder os seus electrões às enzimas dos complexos respiratórios uma vez que o oxigénio tem um  $\Delta G^0$  mais negativo. Assim vários autores preconizam (Mayer *et al*, 1990, [19]) que para evitar esta re-oxidação do DPIP seja usado cianeto ou azida por inibir a transferência de electrões do complexo IV para o receptor final, o oxigénio. Os electrões deixam de poder fluir ao longo da CTE sendo aceites pelo DPIP que, nesta situação, não retorna a azul (mantém-se sempre reduzido).

Da análise da figura 22 verifica-se que a redução do DPIP pelo succinato é maior na presença do KCN o que se deve ao facto deste inibidor actuar ao nível do complexo IV impedindo que o fluxo de electrões para o oxigénio se faça.



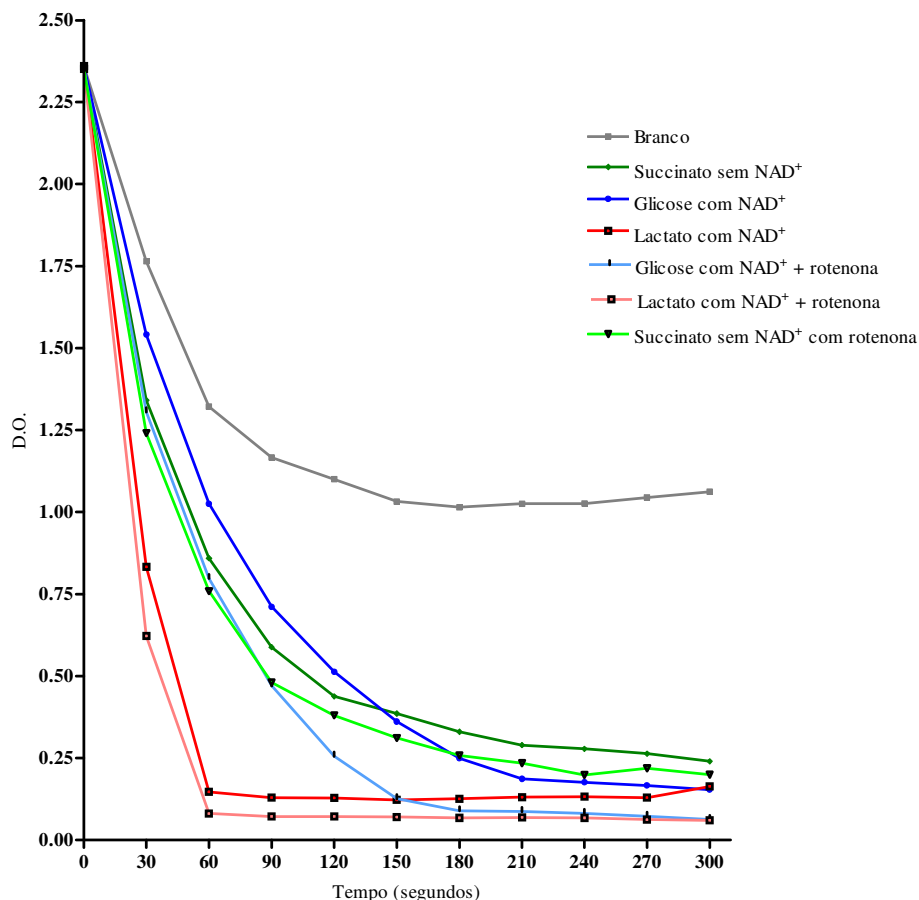
**Figura 22 – Efeito do KCN e do Malonato sobre o succinato.** Fez-se reagir succinato 15mM e DPIP 0,167mM com 1ml de hamogeneizado num volume final de 3ml. Em vários tubos foram criadas diferentes situações com inibidores: KCN 1mM, malonato 3mM e rotenona 1,5mM. O volume de 2ml foi completado com tampão fosfato 50mM. A reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado (volume final de 3ml). A redução do DPIP foi acompanhada por leitura ao espectrofotómetro ( $\lambda=600\text{nm}$ ) ao longo de 300 segundos.

Estes electrões são captados pelo DPIP que é reduzido muito mais rapidamente do que na ausência do KCN, como aliás já foi referido anteriormente. Na presença de malonato a redução do DPIP é mais lenta uma vez que este inibidor compete com o succinato pelo centro activo da succinato desidrogenase. O malonato é um inibidor competitivo que se liga ao complexo II impedindo a ligação do succinato e, deste modo, não há passagem de equivalentes redutores para o DPIP que se mantém azul (forma oxidada).

Os dados da figura 22 confirmam o efeito de inibição competitiva do malonato uma vez que aumentando a concentração do succinato há uma maior redução do DPIP (a curva roxa refere-se a succinato 15 mM e a curva lilás refere-se a succinato 25 mM para a mesma concentração de inibidor). Tal facto deve-se a que aumentando a concentração de succinato em relação à de malonato o número de colisões das moléculas de succinato com o centro activo da enzima aumenta e há cedência de

electrões e, portanto, há uma maior redução do DPIP. Em relação à acção da rotenona como inibidor pode-se concluir que a diferença da velocidade de redução do DPIP sem e com rotenona é praticamente nula, o que está de acordo com a literatura clássica. A rotenona, ao inibir o complexo I, não tem um efeito directo sobre a oxidação do succinato não devendo afectar a descoloração do DPIP. O succinato é um substrato do ciclo do ácido cítrico que cede os seus electrões à única enzima deste ciclo que faz parte da cadeia respiratória e que se localiza na MMI. O succinato atravessa a membrana mitocondrial interna através de um antiporte com hidrogeno e é oxidado ao nível do complexo II passando a fumarato. No complexo II o aceitador dos electrões é uma flavoproteína (FAD) que os cede ao DPIP.

Da análise da figura 23 verifica-se que, quer na ausência quer na presença de rotenona, há sempre descoloração do DPIP. O efeito da rotenona sobre o succinato, como já foi referido, deveria ser nulo uma vez que o succinato cede os seus electrões ao complexo II e a rotenona é um inibidor do complexo I. Portanto, a velocidade de redução do DPIP, sem e com rotenona, na presença do succinato deveria ser igual. Nota-se, no entanto, um ligeiro aumento da velocidade de redução do DPIP que se deverá à presença de substratos endógenos no homogenizado.



**Figura 23 - Efeito da rotenona sobre a glicose, lactato e succinato.** Numa série de tubos com substrato, DPIP 0,167mM e  $\text{NAD}^+$  1mM (nos tubos com glicose e lactato) prefez-se o volume de 2ml com tampão fosfato 50mM. Noutra série de 3 tubos procedeu-se de igual fazendo actuar o inibidor rotenona 5 $\mu$ M. A reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado. As reacções decorrem num volume final de 3ml e a concentração dos substratos foi de: Glicose e Succinato 7,5mM, Lactato 15mM. A redução do DPIP foi verificada ao espectrofotómetro ( $\lambda=600\text{nm}$ ) ao longo de 300 segundos.

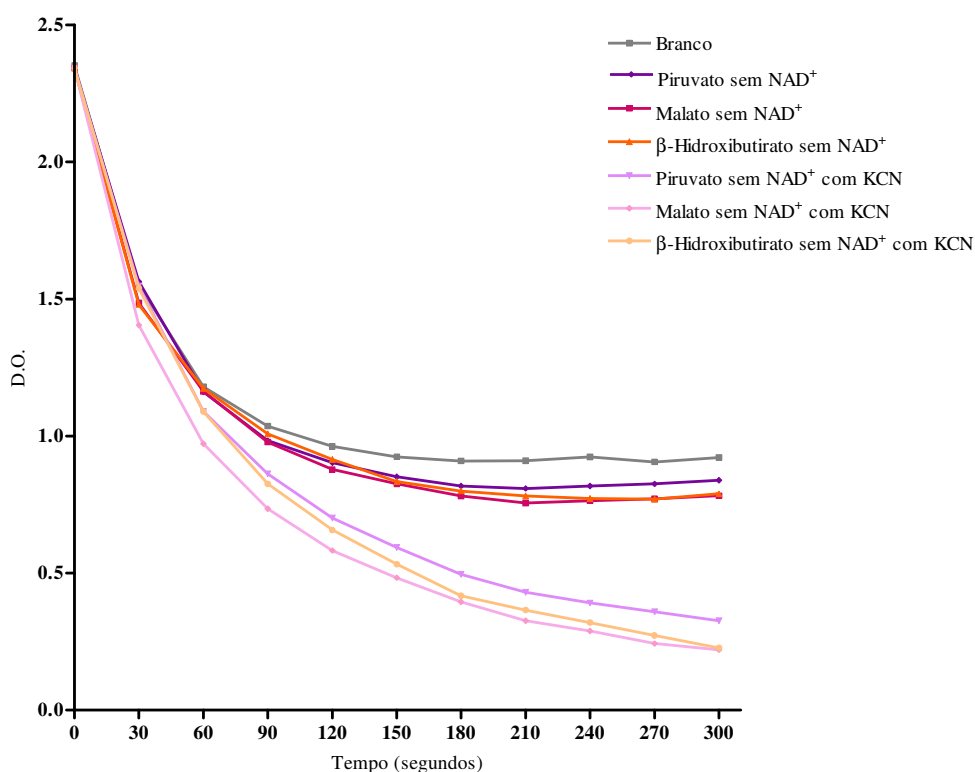
Na presença de rotenona a velocidade de redução do DPIP é um pouco maior com todos os substratos embora o seja mais evidente no caso da glicose. Os equivalentes redutores resultantes da oxidação da glicose e do lactato entram na mitocôndria através de um dos “shuttles”. A cedência dos equivalentes redutores a  $\text{NADH}$  mitocondrial vai fazer com que entrem na CTE ao nível do complexo I. Este contém uma flavina mononucleótido (FMN) que depois cede os electrões recebidos ao DPIP.

A rotenona é um inibidor competitivo do complexo I impedindo a passagem dos electrões do centro Fe-S para a ubiquinona (Scheffler, 2001). Estando este complexo



inibido a redução do DPIP é mais rápida uma vez que eles não podem prosseguir ao longo da CTE. No entanto, as diferenças verificadas não foram tão acentuadas como seria de esperar.

Os resultados na figura 24 mostram que há uma redução muito ligeira do DPIP na presença do piruvato,  $\beta$ -hidroxibutirato e malato em relação ao branco, sendo o comportamento idêntico para os três substratos. Na presença do KCN a redução do DPIP é evidente, e semelhante, para os três substratos. O piruvato, malato e  $\beta$ -hidroxibutirato são três substratos mitocondrias que necessitam ser transportados para o interior da mitocôndria para poderem ser oxidados.

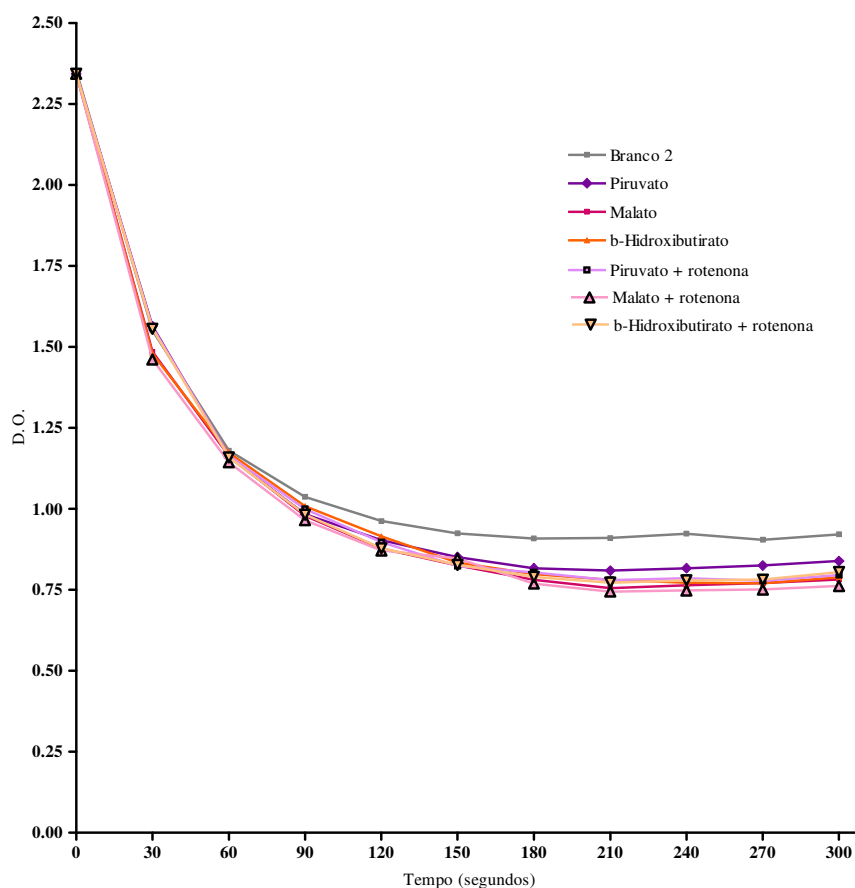


**Figura 24 - Efeito do KCN sobre o Piruvato, Malato e  $\beta$ -Hidroxibutirato.** Em 3 tubos fez-se reagir 0,5ml de cada substrato e 0,5ml de DPIP 1mM. Noutra série de 3 tubos procedeu-se de igual forma mas foi usado KCN 1mM (no tubo) como inibidor. O volume final de 2ml foi completado com tampão fosfato 50mM e a reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado. A concentração dos substratos no volume final foi: Malato e  $\beta$ -Hidroxibutirato 3,75 mM, Piruvato, 0,667 mM. A redução do DPIP foi acompanhada pelo decréscimo da D.O. a 600nm ao longo de 300 segundos.

O transporte destes substratos através da MMI é feito por proteínas transportadoras. A oxidação destes substratos é feita com a passagem dos equivalentes redutores para o  $\text{NAD}^+$  mitocondrial que passa a NADH. Este cede os seus electrões à CTE no complexo

I. Quando é adicionado KCN o complexo IV é bloqueado e os electrões como não conseguem seguir através da CTE são cedidos ao DPIP através da flavoproteína do complexo I. Nesta situação a redução do DPIP na presença destes substratos é evidente.

Observando os resultados da figura 25, e tendo como comparação o branco, a descoloração do DPIP é muito reduzida, quer na ausência quer na presença da rotenona. Os substratos utilizados são oxidados no interior da mitocôndria usando o  $\text{NAD}^+$  mitocondrial que recebe os seus electrões e os canaliza para a CTE ao nível do complexo I.



**Figura 25 – Efeito da rotenona sobre o Piruvato, Malato e  $\beta$ -Hidroxibutirato.** Em tubos com 0,5ml de cada substrato e 0,5 ml de DPIP 1mM completou-se o volume de 2ml com tampão fosfato 50mM. Noutra série de tubos procedeu-se de igual forma mas foi adicionado 45  $\mu$ l rotenona (5  $\mu$ M no tubo). A reacção foi iniciada com a adição de 1 ml de homogeneizado (volume final de 3ml). A concentração final dos substratos foi: Malato e  $\beta$ -Hidroxibutirato 3,75 mM, Piruvato, 0,667 mM. A redução do DPIP foi registada ao longo de 300 segundos por técnica espectrofotométrica ( $\lambda=600\text{nm}$ ).

Era de esperarar que o DPIP ficasse incolor pois os substratos ao serem oxidados por redução do  $\text{NAD}^+$ , passariam os electrões para o DPIP directamente ou via a flavoproteína do complexo I. Na presença da rotenona seria de esperar que a redução do DPIP fosse ainda mais rápida.

A rotenona inibe o complexo I na passagem dos electrões do centro Fe-S para a ubiquinona. Os electrões cedidos ao complexo I são captados por uma flavoproteína que depois os pode ceder ao DPIP uma vez que eles não podem prosseguir pela cadeia respiratória pois está bloqueada. Os resultados obtidos não permitiram tirar conclusões sobre o tipo de acção da rotenona sobre estes substratos testados. Podem-se colocar algumas hipóteses para explicar o facto de os dados não terem correspondido ao esperado: a rotenona, sendo um inibidor competitivo, poderia ter que estar presente numa concentração maior de modo a ter uma acção mais evidente; os substratos têm de ser transportados para dentro da mitocôndria e os sistemas de transporte podem não estar funcionais; os substratos podem estar em concentrações que inibam os transportadores membranares; o tempo ter sido insuficiente, já que o transporte do piruvato parece ser lento conforme descrito por Halestrap (1975); as mitocôndrias podem não estar íntegras não dispondo de “pool” de  $\text{NAD}^+$  intramitocondrial para que a reacção possa decorrer.

## **Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE**

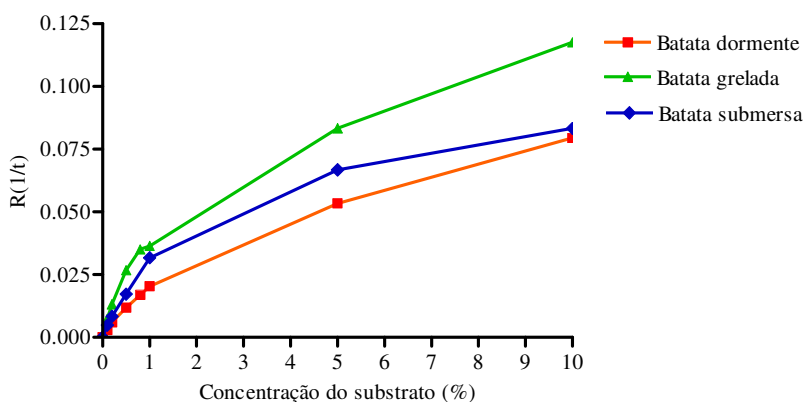
Com a realização deste protocolo pretendeu-se explorar o efeito de diferentes factores físico-químicos na actividade enzimática da catalase. Procurou-se reproduzir de um modo simples experiências cujos resultados estão amplamente descritos nos livros e, desse modo, foi utilizado um homogeneizado de batata como fonte de catalase e os factores estudados foram: velocidade de reacção em função da concentração do substrato, concentração da enzima, tempo de reacção, temperatura, pH, inibidores e condições de stress. Foram usados três lotes de batata: batata dormente (nova), batata gelada e batata submersa durante 24h em água. O objectivo era verificar se as diferentes condições metabólicas em que as batatas se encontravam provocariam

alterações na quantidade de catalase. Esta enzima é uma das defesas anti-oxidantes utilizadas pelos seres vivos em situações de stresse oxidativo.

A actividade da catalase varia significativamente de uma fonte para outra. Outras fontes de catalase são: cebolas, cenouras, espinafres, rebentos, nabos, rabanetes damascos, brócolos, bananas, sangue, fígado e leite cru. Os frutos têm geralmente menor actividade da catalase talvez devido à sua maior acidez (Kimbrough *et al*, 1997). Assim, as experiências realizadas com catalase de outras fontes poderão dar resultados experimentais ligeiramente diferentes.

Os resultados apresentados nas figuras seguintes são a média de dois ensaios em duplicado realizados para cada lote de batatas à excepção do efeito do inibidor que só foi feito com batata nova e do efeito da temperatura que não foi testado com o lote de batata gelada.

Pela análise da figura 26 verifica-se uma subida da actividade da enzima com o aumento da concentração do substrato começando a haver uma inflecção da curva para concentrações acima de 1-2% de substrato. Verifica-se ainda que a actividade da catalase é maior na batata gelada do que para a batata submersa e desta para a batata dormente.

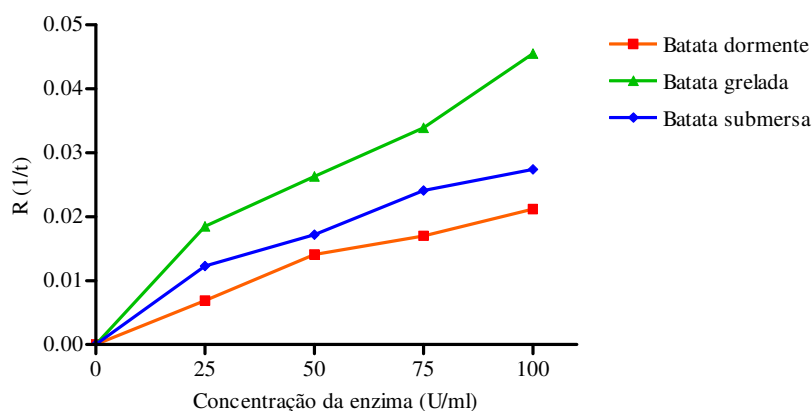


**Figura 26 - Efeito da concentração do substrato na actividade da catalase nos três lotes de batata.** O extracto enzimático foi obtido por homogenização (50gr batata/250ml de tampão fosfato. Com esta concentração de enzima foi determinada a velocidade de reacção em função da concentração do substrato (peróxido de hidrogénio): 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1%, 5% e 10%. A actividade da enzima foi calculada como o inverso do tempo que o disco demora a regressar à superfície,  $R=1/t$ .

A catalase é uma molécula tetramérica, constituída por quatro cadeias polipeptídicas com quatro grupos prostéticos hema com Fe(III) nos locais activos da

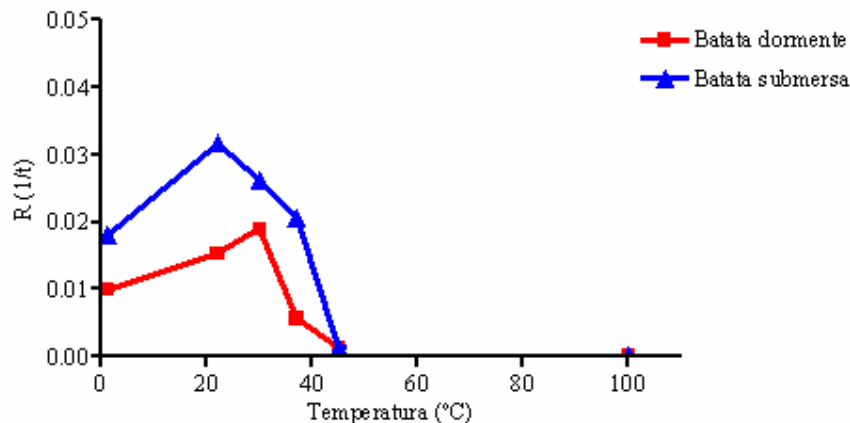
enzima que se oxida a Fe(IV) (Kimbrough *et al*, 1997). A velocidade de reacção aumenta com a concentração do substrato até ao momento em que todos os locais activos da enzima se encontram ocupados. A partir daí a velocidade mantém-se constante enquanto houver substrato.

Para os três lotes de batata é possível constatar que a velocidade de reacção aumenta numa proporção directa com o aumento da concentração da enzima, isto é, quanto mais enzima estiver presente maior é a quantidade de produto que pode ser degradado enzimaticamente pois existem mais locais activos da enzima disponíveis para se ligarem ao peróxido de hidrogénio e fazer a sua conversão em água e oxigénio (figura 27). Mais uma vez se verifica que a actividade enzimática é maior na batata grelada e menor na batata dormente.



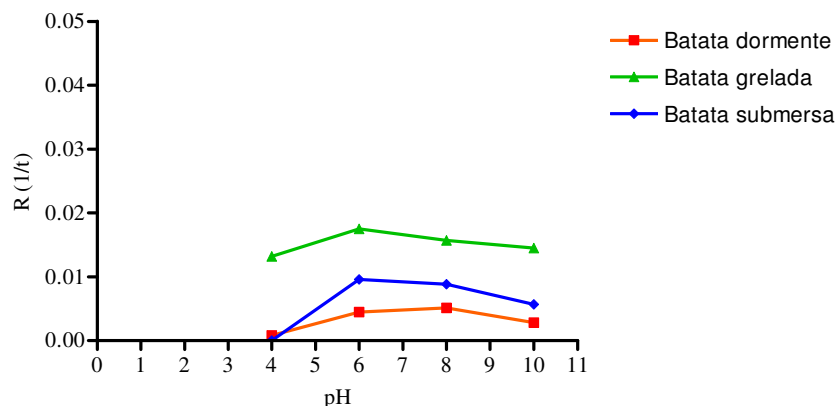
**Figura 27 - Efeito da concentração da enzima na actividade da catalase nos três lotes de batata.** À concentração de enzima obtida após trituração de 50gr de batata para 250ml de volume final de homogeneizado foi atribuído o valor de 100U de enzima por ml. A partir desta concentração foram realizadas várias diluições da enzima (25U/ml, 50U/ml, 75 U/ml e 100U/ml) de forma a se poder avaliar o efeito da concentração enzimática na actividade da enzima.

A figura 28 mostra o efeito da temperatura na actividade da catalase relativamente ao lote batata dormente e ao lote batata submersa. Tal como previsto a actividade da catalase foi menor a baixas temperaturas.



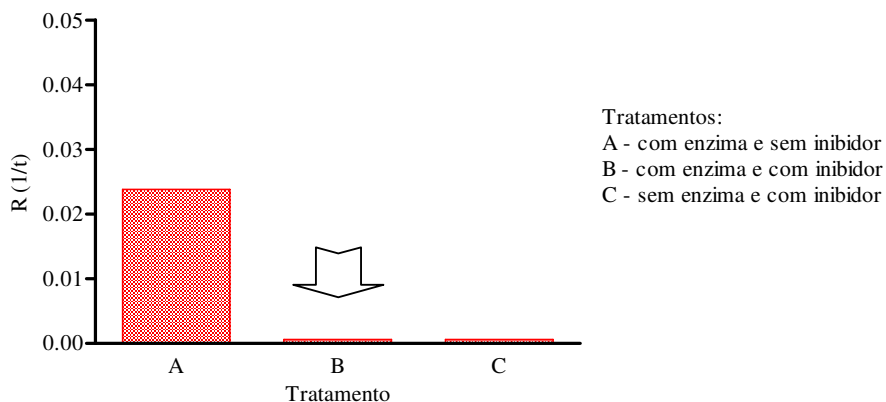
**Figura 28 - Efeito da temperatura na actividade da catalase em dois lotes de batata: batata dormente e batata submersa.** Tendo-se utilizado o extracto enzimático directamente obtido após homogeneização (100U/ml) foi avaliada a influência da temperatura na actividade enzimática. Amostras de extracto enzimático e de peróxido de hidrogénio foram colocados às diferentes temperaturas a testar (0°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C e 100°C) de forma a estarem à temperatura correcta antes de se iniciar a reacção.

Na verdade, a baixas temperaturas é de esperar uma menor cinética das moléculas e uma menor probabilidade de ocorrerem colisões devidamente orientadas e também uma maior rigidez estrutural das unidades enzimáticas, pelo que a decomposição do peróxido de hidrogénio foi mais lenta, conforme é observado por Marques (2004). Para temperaturas superiores a 45°C não se verificou mais actividade da enzima certamente devido à sua desnaturação tornando-a praticamente inactiva. Foi realizado o teste com batata cozida (100°C) tendo servido como tubo controlo uma vez que prova que não há acção da catalase por modificação conformacional irreversível. A temperatura óptima para a batata submersa (20°C) é inferior à encontrada para a batata dormente (37°C). Na literatura vem referido, no entanto, que a temperatura pouco afecta a actividade das catalases de origem vegetal entre os 0 e 40°C (Trindade *et al*, 1988; [26]).



**Figura 29 - Efeito do pH na actividade da catalase nos três lotes de batata.** As soluções de peróxido de hidrogénio foram preparadas com soluções tampão fosfato 50mM com pH específicos (pH 4, 6, 8 e 10) tendo-se procedido à realização do teste mergulhando os discos de fibra de vidro encharcados com o extracto enzimático (100U/ml) nos copos com o pH respectivo.

Os resultados da figura 29 mostram que, nos ensaios efectuados, o pH óptimo encontrado se situa à volta de pH 6 havendo uma maior tolerância na batata dormente pois a actividade da enzima aumentou ligeiramente entre pH 6 e 8. Também nesta situação, e para um mesmo valor de pH, a actividade enzimática da catalase era maior na batata grelada e menor na batata dormente. Na literatura foram encontrados diferentes valores para pH óptimo da catalase do tubérculo de batata variando entre 5.5 - 6 (Dekock *et al*, 1979) e 7 (Kimbrough *et al*, 1997). De acordo com a literatura, certas catalases de origem vegetal apresentam maiores limites de tolerância permanecendo estáveis num limite entre pH 6 e 10 (Trindade *et al*, 1988; Yoruk *et al*, 2005). A função de uma proteína está dependente da sua estrutura terciária. O pH pode provocar alterações ao nível dessa estrutura terciária (desnaturação) e tornar a enzima não funcional devido a alterações das interações electrostáticas entre as cargas dos aminoácidos [27, 28]. A influência do pH deve-se ao facto de tanto o substrato como o centro activo da enzima conterem grupos químicos funcionais de carácter ácido ou básico, cujos estados de ionização dependem do pH do meio onde a reacção se desenvolve (Marques, 2004). Se houver alteração das cargas eléctricas deixam de se estabelecer determinadas ligações entre os aminoácidos da cadeia polipeptídica da enzima ou entre esta e o substrato, por alteração da conformação da enzima e, consequentemente, do seu centro activo.



**Figura 30 – Efeito da metilhidroxilamina na actividade da catalase.** A 1ml de extracto enzimático foram adicionados 50µl de metilhidroxilamina a 10% que se deixaram actuar durante 1 minuto (tratamento B indicado com uma seta). A e C funcionam como controlos comprovando, respectivamente, que a enzima estava activa e que o inibidor *per si* não condiciona o resultado.

Verificou-se que na presença de metilhidroxilamina (figura 30) a reacção não decorreu mantendo-se o disco no fundo da copo e não havendo libertação de bolhas de oxigénio resultantes do desdobramento do peróxido de hidrogénio pela catalase, conforme indicado pela seta. Esta experiência fez-se decorrer durante 20 minutos, um tempo muito superior ao geralmente necessário para a subida dos discos. A metilhidroxilamina é um inibidor da catalase que actua por ligação ao átomo de ferro do grupo prostético da enzima, interferindo na formação do complexo enzima-substrato.

Os resultados expressos nas figuras 26 a 29 mostram que a actividade da catalase é menor no lote de batata dormente e maior nos lotes de batatas submetidas a condições de stresse: germinação e submersão em água durante 24 horas. A germinação dos gomos desencadeia uma intensa actividade metabólica na polpa das batatas, onde a rápida mobilização do amido e de outros compostos disponibiliza os substratos essenciais para a produção de energia e para a biossíntese de proteínas (Hartman *et al*, 1997) necessárias ao crescimento de novos caules. Por outro lado, no lote de batatas submersas na água durante 24 horas a actividade da catalase também aumentou o que poderá resultar da situação de ausência de oxigénio a que foram submetidas (Marques, 2004).

Durante uma situação de anoxia (que ocorre enquanto a planta está submersa) há uma redução nos fluxos de iões e proteínas induzindo uma situação de redução do consumo de energia. De acordo com Greenway, H. e Gibbs, J., (2003) a descida

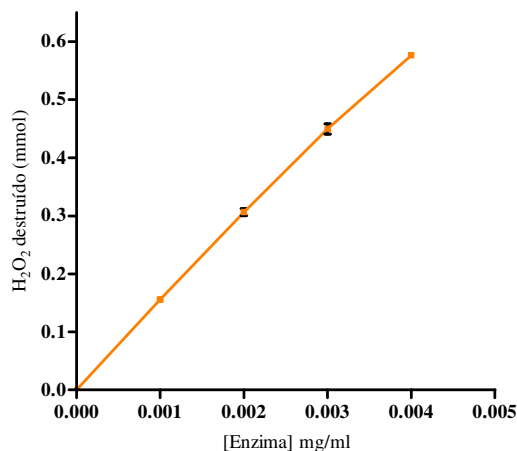


moderada do pH citosólico de 7.5 para 7.0, aproximadamente, que se verifica nessas situações, resulta na adaptação do metabolismo a condições de baixa disponibilidade energética levando, por exemplo, à redução da síntese proteica e à estimulação da fermentação alcoólica. Esta estimulação da produção de etanol nas plantas submetidas a uma situação de stress por emersão em água pode dever-se a um mecanismo que envolve duas fases: em reacção à anoxia, o piruvato seria primeiro convertido em ácido láctico, o que leva à diminuição do pH intracelular; esta acidificação do meio traduzir-se-ia numa inibição da lactato desidrogenase e num aumento da actividade das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase envolvidas na biossíntese de etanol, o que se conjuga para a acumulação deste composto na polpa das batatas emersas em água (Arteca, 1997; Zyprian, 1997 *in* Marques, 2004). Por sua vez, a acumulação de etanol dota os tecidos vegetais com uma maior capacidade para decompor o peróxido de hidrogénio de acordo com Marques (2004) e Roberts *et al* (1984).

### **Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA**

Tirando partido de uma metodologia mais elaborada pretendeu-se chegar a dados que experimentalmente comprovassem o que vem descrito classicamente nos livros. A catalase, sendo uma enzima, vai actuar de modo diferente se se fizerem variar factores físico-químicos como a temperatura e o pH. A técnica utilizada possibilita a quantificação da actividade da enzima de modo mais rigoroso. Permite, além disso, fazer um estudo da cinética enzimática com determinação prática de parâmetros como o  $V_{\text{máx}}$  e o  $K_M$  cujo conhecimento permite fazer abordagens associadas ao transporte de substratos, velocidade de reacções e biotecnologia.

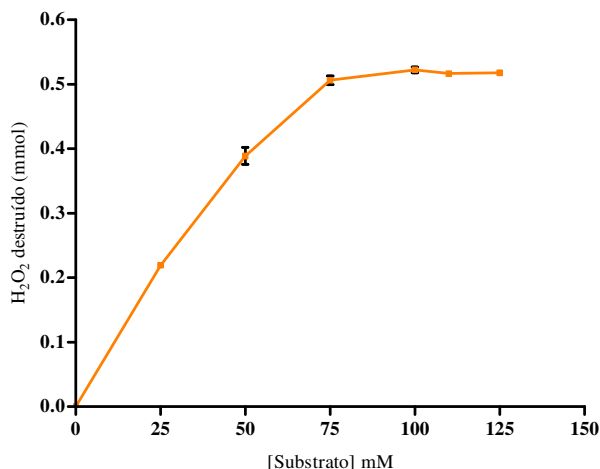
➤ **Determinação da actividade da catalase**



**Figura 31 – Efeito da concentração da enzima.** Em 4 copos com 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1M foi adicionada enzima de modo a obter uma concentração final de 0.001, 0.002, 0.003 e 0.004 mg/ml. Após 5 min de catálise a reacção foi parada através da adição de 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M tendo-se procedido à titulação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanescente com KMnO<sub>4</sub> 0.05M. As reacções decorreram à temperatura ambiente (22-25°C). Os dados apresentados correspondem à média de três determinações independentes e respectivos desvios padrão.

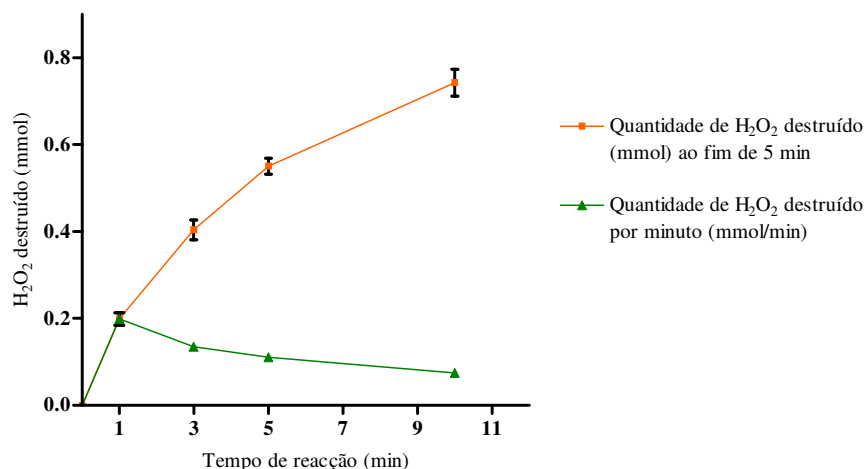
Conforme se vê na figura 31, a concentração da enzima pode afectar a velocidade da reacção. Como se pode comprovar há uma relação linear entre a concentração da enzima e a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruído num determinado período de tempo.

Conforme o esperado, os dados da figura 32 mostram que a velocidade com que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é degradado aumenta com a concentração do substrato porque aumentam as hipóteses de colisões provocadas pelo movimento térmico aleatório das moléculas presentes (maior número de moléculas maior a hipótese de colisão). Para baixas concentrações a taxa de reacção é directamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogénio existente na solução. Se existir uma quantidade dupla de moléculas de substrato na solução, duplica a hipótese de encontrar uma molécula de enzima no mesmo espaço de tempo, admitindo que todas as moléculas de substrato se movem a velocidades semelhantes (Campos, 2002, [29]). Para concentrações mais elevadas de substrato, a velocidade de reacção atinge o seu máximo correspondendo a uma situação em que todos os locais activos da enzima estão ocupados.



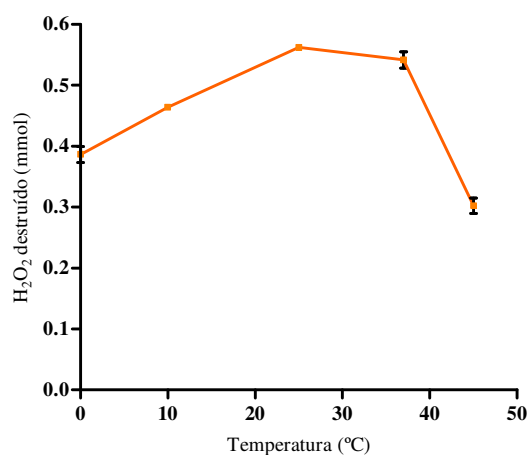
**Figura 32 - Efeito da concentração do substrato na actividade da catalase.** Foram preparados copos com 10ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações indicadas no gráfico; adicionou-se 1 ml enzima 0.04 mg/ml (concentração final da enzima no copo 0.004 mg/ml). Após 5 min a reacção foi parada com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e procedeu-se à sua titulação com KMnO<sub>4</sub> 0.05M. Os dados apresentados correspondem à média de 7 determinações independentes e respectivos desvios padrão (à excepção das concentrações 110 e 125 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> onde só se fizeram duas determinações).

Na figura 33 estão apresentadas duas curvas. A curva cor-de laranja corresponde à actividade da enzima medida ao fim de 1,3,5 e 10 minutos; a curva a verde refere-se à actividade da enzima por minuto ao fim dos mesmos tempos. Para uma determinada quantidade de enzima e de substrato verifica-se que a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruído aumenta com o tempo. Contudo esse aumento não é linear. Na verdade, a curva verde mostra que a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruído por minuto é maior durante o primeiro minuto vindo a decrescer a partir daí. Como já foi referido, no início da reacção as moléculas de enzima têm os seus locais activos livres pelo que a reacção com o substrato é muito rápida e directamente proporcional à quantidade de enzima disponível (reacção de 1º ordem). Contudo, conforme a enzima começa a estar com os seus centros activos ocupados pela substrato a velocidade de reacção começa a diminuir o que corresponde a uma situação de saturação da enzima (e onde a velocidade de destruição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por unidade de tempo diminui e se torna constante – reacção de ordem zero).



**Figura 33 - Efeito do tempo de reacção.** Foram preparados 5 copos com 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM aos quais foi adicionado 1 ml de enzima 0.04 mg/ml. A reacção foi interrompida por adição de ácido ao fim do tempo indicado no gráfico (0, 1, 3, 5 e 10 min) procedendo-se posteriormente à determinação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por titulação. Os dados apresentados são uma média de 3 determinações e respectivos desvios padrão.

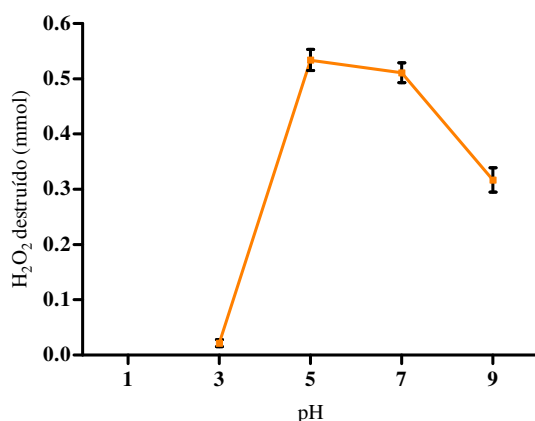
Os resultados obtidos (figura 34) indicam que a temperatura óptima da enzima se situa entre 25 e 37°C. No entanto, mesmo para temperaturas baixas a actividade é ainda bastante elevada o que indica uma razoável resistência da enzima a estas temperaturas. Para temperaturas superiores a 37 °C verifica-se um decréscimo acentuado da actividade enzimática.



**Figura 34 – Efeito da temperatura na actividade enzimática da catalase.** Aliquotas da solução enzimática 0.04 mg/ml foram colocadas a diferentes temperaturas. O mesmo procedimento foi feito com copos com 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esperou-se que todas as soluções estivessem à temperatura correcta antes de se iniciar a reacção tendo-se, posteriormente, procedido da forma já descrita. As reacções decorreram a diferentes temperaturas (0, 10, 25, 37 e 45°C) Os dados apresentados correspondem à média de 2 determinações independentes e respectivos desvios padrão.

A temperatura actua sobre a velocidade da reacção enzimática, tal como acontece com qualquer reacção química. No entanto, no caso das enzimas o efeito produzido é mais complexo devido à natureza proteica da enzima. Um aumento da temperatura pode aumentar a velocidade de reacção porque a energia livre das moléculas também aumenta, isto é, as moléculas movem-se mais rapidamente e a probabilidade de se encontrarem aumenta também. Portanto, para temperaturas inferiores à temperatura óptima a reacção ocorre mais lentamente (menor temperatura implica um menor movimento das moléculas e uma maior dificuldade para que a reacção ocorra); com um novo aumento da temperatura a enzima retoma a sua actividade normal. O aumento da temperatura acima de um determinado valor (temperatura de desnaturação) afecta consideravelmente a estrutura terciária da enzima, bem como a estabilidade do complexo enzima-substrato (Taipa *et al*, 2003). A velocidade de reacção tem um máximo que corresponde à temperatura óptima. Para valores superiores de temperatura há uma rápida perda de actividade que resulta da desnaturação da enzima.

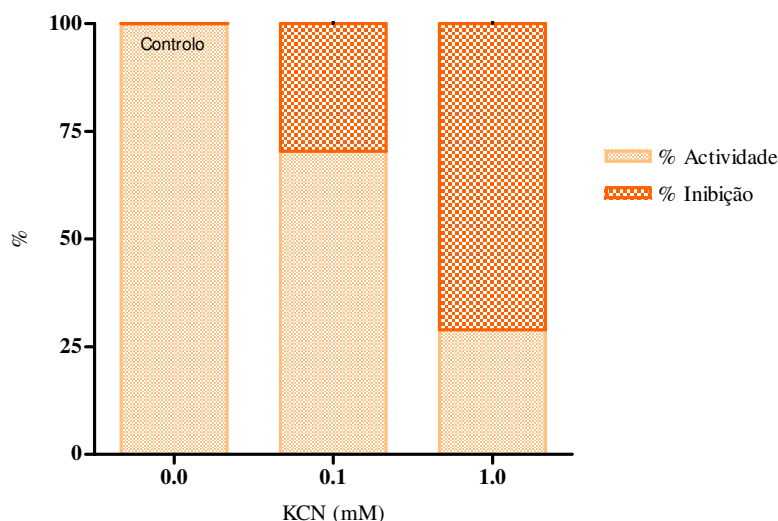
A figura 35 apresenta os resultados obtidos relativamente ao efeito do pH sobre a catalase. Verifica-se que a enzima só é activa para valores de pH acima de 3 e que, para valores superiores a 8, a velocidade de reacção enzimática começa a diminuir rapidamente, sendo o pH óptimo de 5. As cadeias laterais dos aminoácidos contêm grupos  $\text{-COOH}$  e  $\text{-NH}_2$  que rapidamente ganham, ou perdem  $\text{H}^+$  (ionizam).



**Figura 35 - Efeito do pH na actividade da enzima.** Foram preparadas soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M em diferentes tampões (pH3, pH5, pH7 e pH9). Ao volume de 10ml destas soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado 1 ml de enzima. Aos 5 min de actuação a reacção foi parada com a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As reacções decorreram à temperatura ambiente (22-25°C). Os dados apresentados correspondem à média de 2 determinações independentes e respectivos desvios padrão.

Conforme o pH diminui, uma enzima tenderá a ganhar iões  $H^+$  o que poderá provocar a alteração da estrutura terciária (desnaturação). Do mesmo modo, conforme o pH aumenta, a enzima perderá iões  $H^+$  e, eventualmente, perderá também o seu centro activo. Quando o substrato apresenta cargas eléctricas, a aproximação deste ao centro activo da enzima depende igualmente da carga dos resíduos envolvidos na ligação. Existe, portanto, para a maioria das enzimas, um valor de pH para o qual a formação do complexo enzima-substrato é favorecida e o valor da actividade biológica é máximo – pH óptimo. Muitas enzimas têm o seu pH óptimo na zona de pH neutro e desnaturam a pH muito alto ou muito baixo. É o caso da enzima em estudo cuja actividade máxima ocorre numa gama de pH entre 5 e 7 conforme se pode ver na figura 35 embora os dados da literatura admitam 7 como o valor do pH óptimo. (Abe, K. *et al*, 1979, Ghadermarzi e Moosavi-Movahedi, 1997).

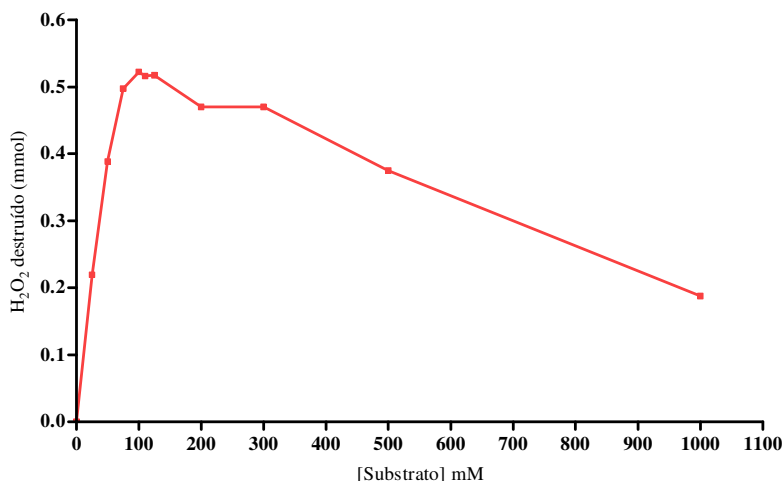
Foi testado o efeito do cianeto de potássio (KCN) na actividade da catalase. Tem sido um dado estabelecido que o cianeto e o  $H_2O_2$  competem pelo mesmo local na molécula de catalase. O cianeto reage com o ferro dos grupos hema impedindo a ligação do substrato.



**Figura 36 - Efeito da concentração de inibidores.** A reacção ocorreu em 10ml de solução  $H_2O_2$  0.1 M com 1 ml de enzima (0.04 mg/ml) e KCN 1mM ou 0.1mM, à temperatura ambiente. Após 5 min de actuação a reacção foi parada com a adição de  $H_2SO_4$  e o  $H_2O_2$  remanescente calculado por titulação. Os dados apresentados em % de Actividade ou Inibição, correspondem à média de 3 determinações independentes sendo o desvio padrão praticamente nulo.

Como se pode observar na figura 36, o cianeto tem uma acção inibidora sobre a catalase sendo o efeito maior conforme aumenta a concentração do inibidor.

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem sido mencionado como tendo um efeito inibitório sobre a catalase quando presente em concentrações elevadas (Ghademarzi *et al*, 1996; Ghademarzi *et al*, 1997; Lardinois *et al*, 1996). Durante a optimização deste protocolo foram testadas várias concentrações de substrato para a selecção das concentrações necessárias para atingir a saturação e cujo resultado se apresenta na figura 37.



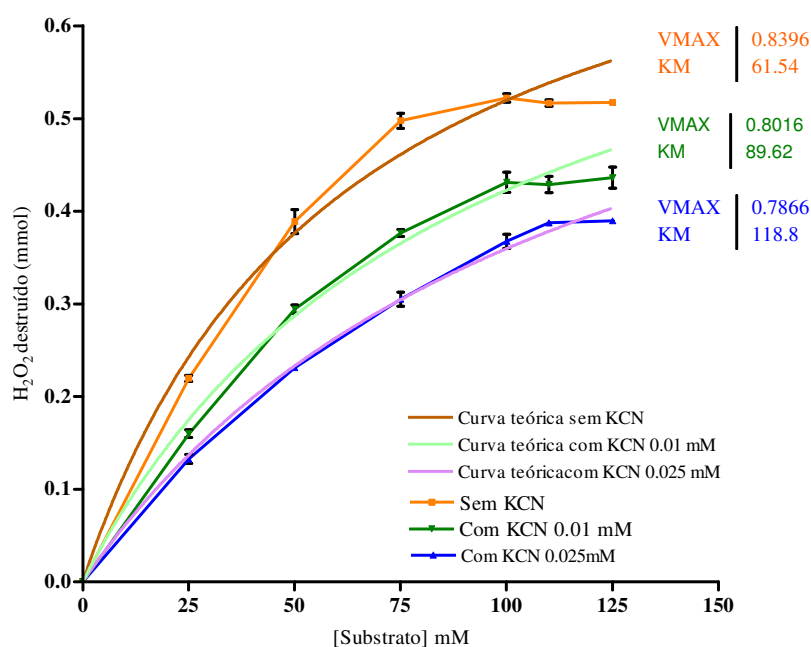
**Figura 37 - Efeito do  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a actividade da catalase.** Foram testadas 10 concentrações diferentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25, 50, 75, 100, 110, 125, 200, 500 e 1000 mM) tendo-se utilizado um volume de 10 ml de substrato onde foi adicionado 1 ml de catalase 0.04mg/ml. A actividade da enzima foi determinada por titulação do peróxido de hidrogénio remanescente como referido nos Materiais e Método.

Os resultados permitem verificar que para concentrações acima dos 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a velocidade de reacção deixa de aumentar em função do aumento da concentração do substrato, e que para valores acima dos 125 mM há um decréscimo nítido na velocidade de degradação do peróxido de hidrogénio. Portanto, para concentrações elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a catalase é inibida pelo próprio substrato. Este facto que ocorre para várias enzimas, aparece descrito em linguagem corrente como resultado da acção de um substrato tóxico ou “suicida” [30].

### ➤ Estudo da cinética enzimática

Devido à elevada eficiência catalítica das enzimas, a concentração de enzima nas misturas reaccionais em que se estuda cinética do estado estacionário é praticamente desprezível quando comparada com a do substrato. Se se seguir o aparecimento de um produto através de medições das suas concentrações em função do tempo, numa determinada experiência, obtém-se a curva experimental de progressão para a reacção.

A velocidade inicial da reacção é igual ao coeficiente angular da tangente à curva no ponto  $t=0$ . As medições experimentais que se fazem são quase sempre medições da velocidade inicial  $v$  de formação de produtos (ou de desaparecimento de substrato). A vantagem de medir velocidades iniciais é que nos instantes iniciais da reacção a concentração de substrato  $S$  ( $[S]$ ) não variou significativamente e é praticamente igual à concentração inicial. Por outro lado, a concentração do produto  $P$  é praticamente nula ( $[P]=0$ ), não havendo necessidade de considerar a reacção inversa (Taipa *et al*, 2003). O estudo da variação da velocidade inicial ( $v$ ) de uma reacção em função da concentração de substrato  $S$  permitiu obter as curvas que estão representadas na figura 38.



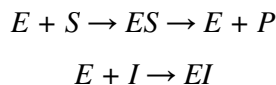
**Figura 38 - Efeito do KCN na actividade da catalase.** Gráfico de saturação da enzima com sobreposição das respectivas curvas teóricas obtidas através do software GraphPad Prism4. As reacções decorreram na presença de 0,04mg/ml de catalase comercial, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os resultados são médias de três experiências independentes.

Os dados obtidos para  $V_{\text{máx}}$  são muito aproximados (0.8396, 0.8016, 0.7866) para as três condições experimentais indicadas enquanto que o  $K_M$  varia sendo de 61.54 mM, 89.62 mM e 118.8 mM, respectivamente. Isto significa que na presença de concentrações crescentes de KCN é necessário uma maior concentração de substrato (maior  $K_M$ ), para atingir a mesma  $V_{\text{máx}}$ . Estes dados permitem concluir que o KCN, ao



contrário do classicamente descrito, tem um efeito inibitório competitivo sobre a catalase.

A inibição por cianeto da catalase tem sido referida como não competitiva apesar do cianeto e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  competirem pelo mesmo local no centro activo da enzima; no entanto, para elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a inibição torna-se claramente competitiva conforme mostra (Ogura *et al*, 2003; [30, 31]). Segundo Zhiyong *et al*, (2000) a reacção é do tipo



Se um inibidor  $I$  se ligar reversivelmente ao centro activo da enzima, impedindo assim a ligação do substrato  $S$  e vice-versa,  $I$  e  $S$  competem para o centro activo e diz-se que  $I$  é um inibidor competitivo. Nestes casos verifica-se que a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) é a mesma porque concentrações infinitamente elevadas de  $S$  removem o inibidor do centro activo da enzima. Os inibidores competitivos apresentam uma certa analogia estrutural com o substrato e podem assim competir com este para se fixarem no centro activo da enzima (Taipa *et al*, 2003).

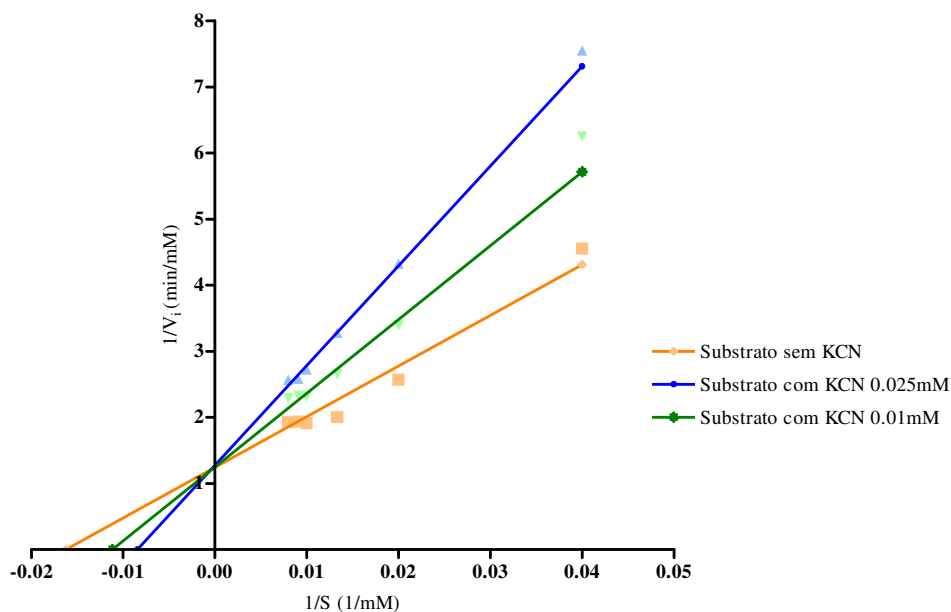
A transformação da equação de Michaelis-Menten numa forma linear (recta do tipo  $y = ax + b$ ) permite a determinação matamética dos parâmetros  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$ . Por inversão directa dos termos da equação de Michaelis-Menten obtêm-se a equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

Representando  $1/v$  em função de  $1/[S]$  obtêm-se uma recta de coeficiente angular  $K_M/V_{\text{máx}}$  com ordenada na origem igual a  $1/V_{\text{máx}}$  e abcissa na origem igual a  $-1/K_M$ , respectivamente. Esta representação permite uma boa estimativa de  $V_{\text{máx}}$  mas não de  $K_M$  [32]; tem, ainda, a desvantagem de comprimir os pontos experimentais correspondentes a concentrações elevadas de substrato numa pequena parte do gráfico e dar ênfase aos pontos relativos a concentrações mais baixas (Taipa *et al*, 2003).

Na figura 39 é possível constatar que enquanto o  $V_{\text{máx}}$  permanece constante, o valor de  $K_M$  é variável sendo maior para a concentração maior de inibidor (0.025 mM). Estes dados permitem concluir que o KCN compete com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo centro activo da enzima uma vez que a afinidade do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela catalase diminui na presença do inibidor. Na presença de um inibidor competitivo,  $V_{\text{máx}}$  não é alterado porque a elevadas

concentrações de substrato o efeito do inibidor torna-se praticamente insignificante e a velocidade máxima de reacção mantém-se. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) é alterada porque na presença de um inibidor a concentração de substrato necessária para atingir essa velocidade máxima será maior [33].



**Figura 39 - Linearização de Lineweaver-Burk relativa ao efeito inibitório do KCN na actividade da catalase.**

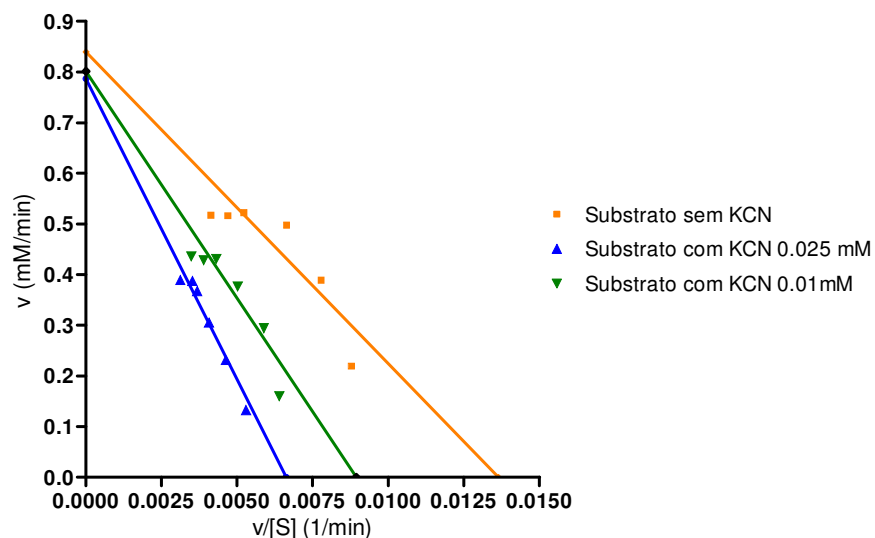
Para ultrapassar as limitações provocada pela linearização de Lineweaver-Burk (compressão dos pontos referentes às concentrações mais elevadas de substrato) recorre-se à equação de Eadie-Hofstee (figura 40). Representando  $v/[S]$  em função de  $v$  obtêm-se uma recta de coeficiente angular  $-K_M$  com ordenada na origem igual a  $V_{máx}$  e abcissa na origem igual a  $V_{máx}/K_M$  (Taipa *et al*, 2003).

Equação da recta é

$$V_i = V_{máx} - K_M \frac{V}{[S]}$$

Através desta transformação todos os dados têm o mesmo peso. No entanto, como ambos os termos são em função de  $v$  os valores podem vir afectados de uma

distorção angular [32], [33]. Através da análise da figura também se pode verificar que os valores de  $V_{\text{máx}}$  são semelhantes (as curvas coincidem no eixo dos Y) enquanto que os valores de  $K_M$  são variáveis (as rectas têm declives diferentes o que é dado por  $-K_M$  [34].

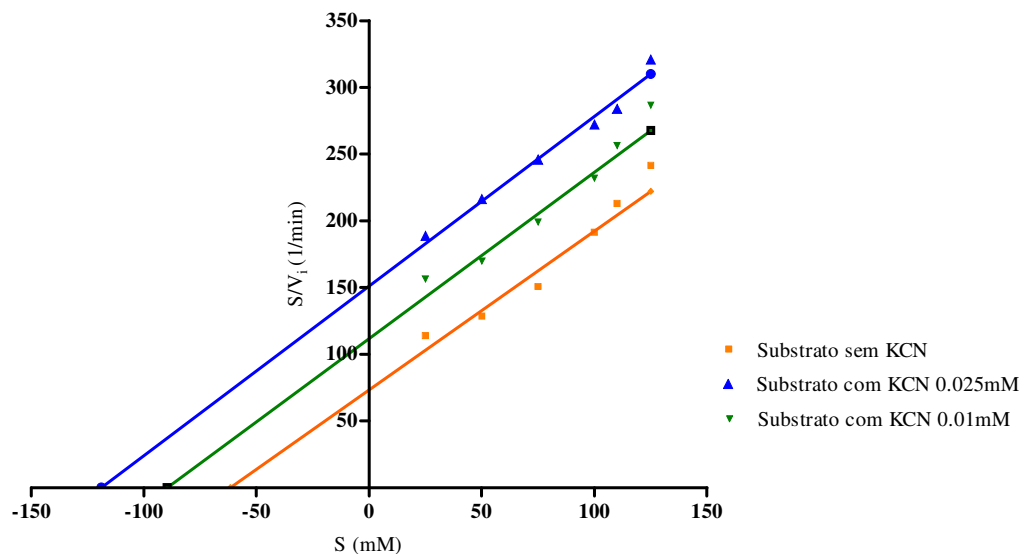


**Figura 40 - Linearização de Eadie-Hofstee relativa ao efeito inibitório do KCN na actividade da catalase.**

A linearização de Hanes-Woolf (figura 41) é outro modo tratar as curvas de saturação e de determinar a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) a partir de dados da velocidade de reacção a diferentes concentrações do substrato. Se se construir um gráfico de  $[S]/V_i$  em função de  $[S]$ , obtém-se uma linha com um coeficiente angular igual a  $1/V_{\text{máx}}$ , ordenada na origem igual a  $K_M/V_{\text{máx}}$  e abcissa na origem igual a  $-K_M$  [35].

Equação da recta é

$$\frac{[S]}{V_i} = \frac{KM}{V_{\text{máx}}} + [S] \frac{1}{V_{\text{máx}}} = \left( \frac{1}{V_{\text{máx}}} \right) (KM + [S])$$



**Figura 41 - Linearização de Hanes-Woolf relativa ao efeito inibitório do KCN na actividade da catalase.**

Este processo de linearização permite a determinação de  $V_{\text{máx}}$  de uma forma mais correcta [32]. O declive das rectas é dado por  $1/V_{\text{máx}}$  verificando-se que todas têm um declive semelhante e portanto, um  $V_{\text{máx}}$  semelhante também. A leitura no eixo das abcissas permite obter  $K_M$  que, neste caso, são diferentes.

Relativamente ao efeito do cianeto atrás descrito (figura 38) qualquer das três linearizações apresentadas (figuras 39, 40 e 41) mostram a mesma tendência de comportamento confirmando o efeito competitivo do KCN de acordo com alguns dados recentes da literatura conforme já foi referido.



## **CONCLUSÕES**



Relativamente à actividade I, a aplicação do protocolo proposto permitiu confirmar que o  $\text{NAD}^+$  é um factor importante na oxidação da glicose e do lactato mas que não é necessário para a oxidação do succinato. O KCN mostrou ter um efeito inibidor da cadeia respiratória que se verificou para todos os substratos utilizados. A rotenona actuou como inibidor do complexo I verificando-se os resultados da sua acção com a glicose e o lactato como substratos. A oxidação do succinato não foi inibida pela rotenona. A sua acção sobre o piruvato, malato e  $\beta$ -hidroxibutirato permite diversas interpretações. Confirmou-se que o malonato actua como inibidor competitivo da succinato desidrogenase.

A actividade II permitiu explorar uma metodologia muito simples para o estudo da influência de factores físico-químicos sobre a actividade da catalase existente num homogeneizado de batata. Foi possível ainda explorar situações de stresse devido a diferentes situações metabólicas tendo-se verificado que a batata grelada é a que desenvolve maior quantidade de catalase e a batata dormente a que produz menos. A actividade enzimática intermédia verificada na batata submersa permite relacionar com o que se passa em situação de hipoxia.

A actividade III permitiu uma exploração mais profunda de conhecimentos relativos à enzimologia, tomando de novo como exemplo o caso da catalase. Os efeitos da concentração da enzima e do substrato, da temperatura e do pH, em relação à actividade da catalase, resultaram de acordo com o descrito na literatura. Relativamente ao efeito do KCN, e contrariamente ao classicamente descrito nos livros de texto, mostrou ter uma acção inibitória competitiva, o que está de acordo com literatura mais actualizada (Ogura *et al*, 2003; [30, 31]). A comparação dos parâmetros cinéticos, expressos por diferentes tipos de linearização, permitiu confirmar o KCN como inibidor competitivo. As diferentes linearizações propostas possibilitam uma diferente distribuição dos pontos correspondentes aos resultados experimentais de forma a minimizar distorções nas rectas. Esta abordagem servirá para esclarecer como resultados experimentais se podem validar com modelos teóricos.

Adicionalmente à adequação das actividades experimentais acima referidas, aos programas dos Ensinos Básico e Secundário, aqui demonstrada, este trabalho permitiu



uma actualização de conhecimentos que em muito contribuirá para um enriquecimento dos conteúdos teóricos a ministrar aos diferentes graus de ensino.

A Introdução deste trabalho resultou de uma intensa pesquisa bibliográfica sobre alguns aspectos do metabolismo oxidativo com especial relevo para o extraordinário melhoramento que a disponibilidade de oxigénio atmosférico trouxe aos seres vivos, do ponto de vista energético, até aos efeitos deletérios que, nos dias de hoje, inevitavelmente exerce sobre os seres vivos. A abordagem de temas como o stresse oxidativo e a morte celular programada constituem, com base na pesquisa efectuada no âmbito deste trabalho, um valor acrescentado na inserção de temas actuais nos conteúdos dos programas do Ensino Secundário com uma chamada de atenção para modos de prevenção de doenças do nosso século em que o stresse oxidativo está envolvido.

## **PARTE II: COMPONENTE PEDAGÓGICA**



## Actividade I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES

### Tópicos

#### Inserção curricular no 10º /11º/12º anos

**Disciplina de Biologia/Geologia-I:** Unidade 3 – Transformação e utilização de energia pelos seres vivos.

**Disciplina de Área Projecto:** Apresentando esta actividade como tema de exploração.

**Justificação:** Na evolução das células eucarióticas, as mitocôndrias tiveram um papel preponderante. Actualmente, a sua integração em muitas actividades da célula, a sua dinâmica como organelo subcelular, e os esforços recentes para a compreensão do papel destes organelos na morte celular programada e em algumas doenças voltam a valorizar o estudo das mitocôndrias e a compreensão dos fenómenos que aí ocorrem.

#### Objectivos:

- # Reconhecer a mitocôndria como o local de realização dos processos de respiração celular.
- # Compreender a relação estrutura/função da mitocôndria.
- # Conhecer as fases da respiração celular.
- # Compreender que as reacções que ocorrem na cadeia de transporte de electrões são reacções redox.
- # Reconhecer a importância do uso de inibidores específicos para a compreensão da cadeia de transporte de electrões.
- # Reconhecer o papel das mitocôndrias no envelhecimento e morte programada de células assim como no aparecimento de algumas doenças.
- # Realizar actividades com aquisição de destreza no manuseamento do material de laboratório

### Aplicação na aula

Se, por um lado, não conseguimos sobreviver sem oxigénio, por outro, ele acaba por se tornar num veneno contra o qual tivemos que adquirir defesas. Actualmente o estudo das mitocôndrias e do seu papel na formação de espécies reactivas de oxigénio, no envelhecimento e morte celular programada e no aparecimento de algumas doenças, originou um novo campo de estudo dentro da bioquímica associado à pesquisa sobre doenças como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson entre outras.

O espaço temporal requerido para o desenvolvimento desta actividade seria de 90'(TP) + 90'(P) + 90' (TP) para o 10º/11º anos, o qual ser prolongado ao nível da disciplina de Área Projecto do 12ºano (TP).

Na primeira aula, o professor iniciaria a actividade colocando algumas questões: *Qual o papel do oxigénio para os seres vivos?; Todos os seres vivos necessitam de*

*oxigénio da mesma maneira?; Que vantagens os seres aeróbios tiraram da utilização do oxigénio?.* Estas questões permitiriam a introdução de conceitos como metabolismo, catabolismo, anabolismo, respiração aeróbia e anaeróbia, processos fermentativos. Seriam explicadas as reacções intervenientes nas 4 fases da respiração aeróbia: glicólise, redução do piruvato, ciclo do ácido cítrico e cadeia de transporte de electrões/fosforilação oxidativa. Após esta introdução ao metabolismo oxidativo, seria entregue e explicado um protocolo. Seria ainda explicado o funcionamento do espectrofotómetro.

Na aula seguinte, prática, proceder-se-ia à realização do protocolo experimental. Devido a ser um protocolo relativamente longo cada grupo ficaria com uma parte do procedimento experimental. *Qual a importância do  $NAD^+$  para o metabolismo oxidativo?; Qual o papel do KCN sobre os substratos testados?; Qual a acção dos outros inibidores testados na cadeia de transporte de electrões?.* Se possível, os alunos fariam os cálculos e preparariam previamente as soluções durante as aulas de Físico-Química pelo que todo o material já estaria pronto, assim como o homogeneizado, previamente preparado pelo professor.

Em aula seguinte os grupos exporiam os resultados obtidos para registo por parte de toda a turma. A partir deste momento iriam ser analisados os gráficos e discutidos os resultados. Após a compreensão dos resultados obtidos e sua interpretação, o professor apresentaria alguns dos problemas relacionados com o facto de os seres vivos viverem numa atmosfera oxidante e que tipos de mecanismos de defesa foram desenvolvendo para sobreviverem.

No final os alunos fariam um relatório da actividade experimental. No 12º ano o trabalho experimental e de pesquisa poderá ser mais longo e aprofundado pois não há uma imposição de conteúdos programáticos a cumprir na disciplina de Área Projecto. O trabalho de pesquisa poderia incidir sobre espécies reactivas de oxigénio e doenças associadas a um mau funcionamento mitocondrial.

## **Protocolo I: ESTUDO DO ESTADO DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES**

### **A. Introdução**

A oxidação final dos produtos do metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, que se formam na célula, ocorre nas mitocôndrias. Dá-se o nome de transporte electrónico ao processo pelo qual os equivalentes redutores, fornecidos pelos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, assim como por outros substratos, são sucessivamente transportados até ao oxigénio molecular.

A cadeia respiratória pode ser separada em 4 complexos enzimáticos:

- NADH-Ubiquinona Redutase (Complexo I)
- Succinato-Ubiquinona Redutase (Complexo II)
- Ubiquinol-Citocromo *c* Redutase (Complexo III)
- Citocromo *c* Oxidase (Complexo IV)

As oxidações nos sistemas biológicos ocorrem por remoção de hidrogénio dos substratos, que são transferidos por um aceitador de electrões, geralmente  $\text{NAD}^+$  ou FAD. Em condições aeróbias, a redução do NADH ou  $\text{FADH}_2$  é seguida por uma transferência sequencial de electrões para o  $\text{O}_2$ , com formação de  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta sequência de compostos redox constitui a cadeia de transporte de electrões, ou cadeia respiratória, que está presente na membrana mitocondrial interna.

No laboratório, o transporte de electrões pode ser estudado, medindo a quantidade de oxigénio consumido com ajuda de um eléctrodo de oxigénio. Alternativamente, pode utilizar-se um composto que actue como aceitador artificial de electrões e cuja cor varie consoante o seu estado oxidado ou reduzido. O 2,6-diclorofenol-indofenol (DPIP) é um indicador de oxidação-redução que aceita electrões de moléculas reduzidas ( $\text{FADH}_2$ ,  $\text{FMNH}_2$  e NADH), sendo azul na forma oxidada e incolor na forma reduzida. Deste modo, a velocidade de transferência de electrões pode medir-se seguindo a “descoloração” do corante usando o espectrofotómetro.

## B. Objectivos

O objectivo deste protocolo consiste na observação do estado de oxidação/redução dos complexos respiratórios da membrana mitocondrial interna (MMI), utilizando diferentes substratos, um homogeneizado de fígado recentemente preparado (ou congelado e mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) e o indicador DPIP. A utilização de um homogeneizado ultrapassa o facto de nas ecolas não existirem centrífugas refrigeradas que permitam o isolamento de mitocôndrias. Por outro lado, torna possível a utilização mais alargada de substratos oxidáveis, nomeadamente substratos citosólicos uma vez que as enzimas da via glicolítica fazem parte do homogeneizado.

## C. Material

Meio isosmótico (meio de homogeneização)	Malato 10 mM	
Fígado de rato	B-Hidroxibutirato 10 mM	
Tampão fosfato de potássio pH 7.4 50 mM	DPIP 1 mM	
Glicose 45 mM	NAD <sup>+</sup> 5 mM	
Succinato 45 mM	Rotenona Solução Stock 1,5 mM	
Lactato 90 mM	Malonato Solução Stock 0,2 M	
Piruvato 4 mM	KCN Solução Stock 100 mM	
Balões volumétricos	Gaze	Tesoura de bicos
Copos volumétricos	Gelo	Pinça
Funil	Tubos de ensaio	Bisturi
Espátula	Banho termostatzado 37°C	Provetas
Waring-Blender (copo misturador)	Termómetro	Pipetas 0.5, 1.0, 2.0 ml
Copo de despejos	Caixas de Petri grandes	Cronómetro
Tabuleiros	Papel	Micropipetas P20, P100, P200 e P1000
Tinas de vidro	Vórtex	Marcadores
Balde de gelo grande	Parafilm	
Espectrofotómetro		

## D. Procedimento

### D.1. Preparação do material biológico

Proceder à homogeneização do fígado de rato num homogeneizador do tipo Waring-Blender em meio isosmótico:

- colocar cerca de 16 g de fígado de rato num copo de vidro contendo um pouco de meio de homogeneização;
- cortar o tecido numa placa de Petri, com auxílio de uma tesoura, em pedaços pequenos, lavando várias vezes para a remoção do sangue;
- adicionar cerca de 200ml de meio de homogeneização e homogeneizar no Waring-Blender (3x durante 15 seg., velocidade 4 num máximo de 7);
- filtrar através de 3 camadas de gase;
- lavar o copo com o restante meio de homogeneização (volume total de 250 ml)
- conservar o filtrado no gelo até ser utilizado.

**Nota:** Durante a realização do protocolo o homogeneizado deve ser mantido em gelo (0 - 4 °C).

### D.2. Necessidade do $\text{NAD}^+$ no processo de respiração celular na presença de Glicose, Lactato e Succinato

- Ligar o espectrofotómetro e calibrá-lo para leituras a 600nm. Usar tampão fosfato 50 mM para acertar a zero.
- Preparar os tubos de ensaio de acordo com o indicado no quadro 1, ajustando o volume final de cada tubo a 2 ml com tampão fosfato:

**Quadro 1**

Tubo (nº)	Tampão fosfato 50 mM (ml)	Substratos (ml)			$\text{NAD}^+$ 5 mM (ml)	DPIP 1 mM (ml)
		Glicose 45mM	Lactato 90mM	Succinato 45mM		
Branco 1	2	—	—	—	—	—
Branco 2	1,5	—	—	—	—	0,5
1	1	0,5	—	—	—	0,5
2	1	—	0,5	—	—	0,5
3	1	—	—	0,5	—	0,5
4	0,4	0,5	—	—	0,6	0,5
5	0,4	—	0,5	—	0,6	0,5
6	0,4	—	—	0,5	0,6	0,5

- Iniciar a reacção pela adição de 1ml de homogeneizado de fígado (volume final da reacção: 3 ml). Toda a reacção ocorre à temperatura ambiente.
- Verter o conteúdo do tubo para uma cuvete adequada à leitura no espectrofotómetro. Registrar a absorvância lida de 30 em 30 seg. até aos 5 min no quadro 2.



Quadro 2

Tempo Tubo (n°)	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'
Branco 1										
Branco 2										
1										
2										
3										
4										
5										
6										

➤ Retirar os valores do branco 1 aos restantes tubos. Construir um gráfico da variação da absorvância ao longo dos 5 min relativo ao efeito do  $\text{NAD}^+$ .

### D.3. Efeito do KCN no processo de respiração celular na presença da Glicose, Lactato e Succinato

➤ Preparar os tubos de ensaio de acordo com o indicado no quadro 3, ajustando o volume final de cada tubo a 2 ml com tampão fosfato:

Quadro 3

Tubo (n°)	Tampão fosfato 50 mM (ml)	Substratos (ml)			$\text{NAD}^+$ 5 mM (ml)	KCN 1 $\mu\text{M}$	DPIP 1 mM (ml)
		Glicose 45mM	Lactato 90mM	Succinato 45mM			
Branco 1	2	—	—	—	—	—	—
Branco 2	1,5	—	—	—	—	—	0,5
7	0,4	0,5	—	—	0,6	30	0,5
8	0,4	—	0,5	—	0,6	30	0,5
9	0,4	—	—	0,5	0,6	30	0,5

➤ Iniciar a reacção pela adição de 1ml de homogeneizado de fígado (volume final da reacção: 3 ml). Toda a reacção ocorre à temperatura ambiente.

➤ Verter o conteúdo do tubo para uma cuvete de leitura ao espectrofotómetro. Registrar a absorvância lida de 30 em 30 seg. até aos 5 min no quadro 4.

Quadro 4

<b>Tempo</b> <b>Tubo (n°)</b>	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'
Branco 1										
Branco 2										
7										
8										
9										

➤ Retirar os valores do branco 1 aos restantes tubos. Construir um gráfico da variação da absorvância ao longo dos 5 min relativo ao efeito do KCN.

#### D.4. Efeito de inibidores específicos da cadeia transportadora de electrões

➤ Preparar uma 3ª série de tubos de acordo com o quadro 5:

Quadro 5

<b>Tubo</b> <b>(n°)</b>	<b>Tampão</b> <b>fosfato</b> <b>50 mM</b> <b>(ml)</b>	<b>Substratos (ml)</b>			<b>NAD<sup>+</sup></b> <b>5 mM</b> <b>(ml)</b>	<b>Inibidores</b> <b>(μl)</b>		<b>DPIP</b> <b>1 mM</b> <b>(ml)</b>
		<b>Glicose</b> <b>45mM</b>	<b>Lactato</b> <b>90mM</b>	<b>Succinato</b>		<b>Rotenona</b>	<b>Malonato</b>	
Branco 1	2	—	—	—	—	—	—	—
Branco 2	1,5	—	—	—	—	—	—	0,5
10	1	—	—	0,5*	—	—	45	0,5
11	1	—	—	0,5**	—	—	45	0,5
12	0,4	0,5	—	—	0,6	10	—	0,5
13	0,4	—	0,5	—	0,6	10	—	0,5

Nota: \* Concentração do succinato 45 mM, \*\* Concentração do succinato 150 mM.

➤ Iniciar a reacção pela adição de 1ml de homogeneizado de fígado (volume final da reacção: 3 ml). Toda a reacção ocorre à temperatura ambiente.

➤ Verter o conteúdo do tubo para uma cuvete de leitura ao espectrofotómetro. Registrar a absorvância lida de 30 em 30 seg. até aos 5 min no quadro 6.

Quadro 6

<b>Tempo</b> <b>Tubo (n°)</b>	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'
Branco 1										
Branco 2										
10										
11										
12										
13										

➤ Retirar os valores do branco 1 aos restantes tubos. Construir os gráficos da variação da absorvância ao longo dos 5 min relativos ao efeito da rotenona sobre os três substratos e ao efeito do malonato sobre o succinato.

#### D.5. Efeito do KCN no processo de respiração celular na presença da Piruvato, Malato e $\beta$ -Hidroxibutirato

➤ Preparar uma 4ª série de tubos de acordo com o quadro 7.

Quadro 7

<b>Tubo</b> <b>(n°)</b>	<b>Tampão</b> <b>fosfato</b> <b>50 mM</b> <b>(ml)</b>	<b>Substratos (ml)</b>			<b>Inibidores</b> <b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>DPIP</b> <b>1 mM</b> <b>(ml)</b>
		Piruvato 4mM	Malato 10mM	B-Hidro- xibutirato 10mM	<b>KCN</b>	
Branco 1	2	—	—	—	—	—
Branco 2	1,5	—	—	—	—	0,5
14	1	0,5	—	—	—	0,5
15	1	—	0,5	—	—	0,5
16	1	—	—	0,5	—	0,5
17	1	0,5	—	—	30	0,5
18	1	—	0,5	—	30	0,5
19	1	—	—	0,5	30	0,5

➤ Iniciar a reacção com a adição de 1ml de homogeneizado. (volume final da reacção: 3 ml). Toda a reacção ocorre à temperatura ambiente.

➤ Verter o conteúdo do tubo para uma cuvete de leitura ao espectrofotómetro. Registrar a absorvância lida de 30 em 30 seg. até aos 5 min no quadro 8.

**Quadro 8**

<b>Tempo</b> <b>Tubo (nº)</b>	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'
Branco 1										
Branco 2										
14										
15										
16										
17										
18										
19										

➤. Retirar os valores do branco 1 aos restantes tubos. Construir os gráficos da variação da absorvância ao longo dos 5 min, relativos ao efeito do KCN sobre os substratos agora em estudo.



## **Actividade II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE**

### **Tópicos**

#### **Inserção curricular no 9º Ano:**

Tema: **Viver Melhor na Terra**

Unidade 3: **Organismo humano em equilíbrio**

**Justificação:** O estudo das enzimas foi muito simplificado ao nível do 9º ano sendo abordado no estudo do sistema digestivo. A proposta desta actividade permitirá aprofundar, embora de uma forma simples, o conhecimento sobre os enzimas tendo em conta que os alunos que não optarem pelo 1º Agrupamento não voltarão a estudar este assunto. Por outro lado, neste nível as enzimas são referidas como associados ao sistema digestivo; o estudo de uma enzima não digestiva (catalase) permitirá aos alunos inferirem a importância das enzimas no funcionamento de todo o organismo.

#### **Objectivos:**

- # Compreender que os alimentos são reservas energéticas.
- # Compreender a importância da utilização dos nutrientes a nível celular.
- # Compreender o conceito de metabolismo.
- # Compreender a natureza e o papel das enzimas
- # Compreender que factores podem afectar a actividade das enzimas
- # Realizar actividades com aquisição de destreza no manuseamento do material de laboratório

#### **Inserção curricular no 10º /11º Anos:**

Unidade 3 de Biologia/Geologia-I: **Transformação e utilização de energia pelos seres vivos**

**Justificação:** Os alunos podem chegar ao 10º ano com uma visão muito simplificada sobre o papel das enzimas no organismo. É relevante, a este nível, que haja uma compreensão da importância das enzimas para os seres vivos, qual a sua natureza, qual o seu modo de actuação e que factores podem interferir nela. É de realçar a importância desta actividade tendo em conta que o estudo das enzimas só é feito ao nível da disciplina optativa de Biologia do 12º ano.

#### **Objectivos:**

- # Compreender a importância do oxigénio para os seres vivos.
- # Compreender o conceito de metabolismo.
- # Compreender a natureza e o papel das enzimas.
- # Compreender que factores podem afectar a actividade das enzimas
- # Reconhecer que os organismos reagem a situações de stress
- # Reconhecer a importância de sistemas enzimáticos como o da catalase para o equilíbrio e saúde do nosso organismo
- # Realizar actividades com aquisição de destreza no manuseamento do material de laboratório

### **Aplicação na aula para o 9º ano**

A abordagem pode ser feita na aula de Ciências Naturais. O espaço temporal necessário seria 45(TP)+90(P)+45(TP).

Os primeiros 45 min seriam uma aula teórico-prática (TP) onde se explorariam os requisitos necessários para a realização e compreensão da actividade experimental, com resolução de uma ficha de trabalho que permitisse o registo dos conteúdos mais importantes. A aula de 90 min seria realizada, de preferência, no laboratório com a turma desdobrada em dois turnos. Os restantes 45 min seriam usados para apresentação dos resultados obtidos, sua compreensão e relacionamento com os conteúdos leccionados. O registo e compreensão dos resultados globais pela turma, facilita a realização de um relatório final.

Durante a primeira aula de 45 min. o professor pode explorar a importância do oxigénio para os seres vivos e como é que eles o utilizam. O professor conduziria agora os alunos para um estudo mais pormenorizado ao nível da célula. Pode explorar o modo como o processo degradativo (respiração aeróbia) ocorre, quais os substratos e produtos desta reacção (sem entrar em grandes pormenores pois não se inserem neste grau de ensino) e a necessidade da presença de enzimas para que todo este processo ocorra. Embora na nova reforma curricular do ensino básico, a natureza e características das enzimas não seja muito realçada é, no entanto, um aspecto importante não sendo novamente focado em níveis de ensino seguintes. Daí a introdução desta actividade prática com a catalase que vai permitir, por um lado, o estudo da natureza de um enzima e dos factores que afectam a sua actividade e, por outro, a compreensão de que os enzimas existem em todos os seres vivos e são essenciais à vida actuando a vários níveis do metabolismo.

No início da aula prática o professor deverá explicar aos alunos o que é a catalase e qual a reacção que ela cataliza, identificando-se os substratos e os produtos da reacção. Pedir-se-ia agora aos alunos que propusessem algumas possibilidades de visualizar esta reacção em laboratório. De seguida o professor propunha a utilização de catalase extraída da batata e que a reacção seria visualizada através da subida de um disco de fibra de vidro a qual ocorreria devido à degradação do peróxido de hidrogénio pela catalase, daí resultando água e oxigénio. Este ficaria retido entre as fibras do disco e fá-lo-ia subir à superfície. A proporcionalidade existente entre o tempo que o disco demora a subir e a quantidade de oxigénio resultante da degradação do peróxido de hidrogénio pela catalase permite obter repostas relativas ao efeito dos factores em causa

sobre a actividade da enzima (catalase). Conforme a turma o professor pode optar por fazer o homogeneizado de batata na aula, juntamente com os alunos, ou tê-lo já previamente preparado explicando como foi feito.

De seguida os alunos usariam o protocolo distribuído para realizar a actividade. Por motivos de tempo de duração das actividades propostas a melhor opção seria dividir a turma por grupos dando a cada um, um dos testes a realizar. Seriam propostos os seguintes testes sobre a actividade enzimática: efeito da concentração da enzima, efeito da concentração do substrato, efeito da temperatura, efeito do pH e efeito da acção de um inibidor. Cada grupo procederia à realização do protocolo que lhe foi entregue e registaria os resultados obtidos.

Na aula seguinte à realização da actividade prática, os grupos exporiam os seus resultados de forma a toda a turma os poder registar. Os alunos iriam reunir esses resultados e identificar de que forma a actividade enzimática é afectada por cada um dos factores e o que isso representa. Posteriormente o professor poderia explorar a importância do sistema enzimático catalase na saúde dos seres vivos servindo de elo de ligação para o último ponto desta unidade (Opções que interferem no equilíbrio do organismo) e para a unidade didáctica seguinte (Unidade 4-Ciência e Tecnologia e qualidade de vida).

Os alunos realizariam no final um relatório onde apresentariam os resultados sob a forma gráfica havendo, desta forma, uma aplicação de conteúdos apreendidos nas disciplinas de Matemática e de T.I.C.

Como resultado da realização deste conjunto de actividades os alunos poderão ter um conhecimento mais integrado dos sistemas que constituem o seu corpo e entender objectivos propostos como “Que hábitos contribuem para uma vida saudável?”, “Como se controlam e regulam os sistemas?”.

### **Aplicação na aula para o 10º /11º anos**

O estudo do metabolismo aeróbio vai permitir a abordagem do sistema catalase como um dos sistemas que contribuem para a eliminação de moléculas tóxicas para o organismo e que se formam, principalmente, na cadeia de transporte de electrões.

O espaço temporal necessário seria 45(TP)+90(P)+45(TP). Os primeiros 45 min. seriam uma aula teórico-prática (TP) onde se explorariam os requisitos necessários para a realização e compreensão da actividade experimental. A aula de 90 min. seria realizada, de preferência, no laboratório com a turma desdobrada em dois turnos, de modo a se



poder realizar a actividade prática (P) propriamente dita. Os restantes 45 min. seriam usados para apresentação dos resultados obtidos e seu relacionamento com os conteúdos leccionados. O registo e compreensão dos resultados globais pela turma, facilita a realização de um relatório final.

Na Primeira aula teórico-prática, os alunos reconhecerão a importância do oxigénio para os seres vivos e irão afirmar que a maioria deles não sobrevivia sem ele. O professor observará que, no entanto, nem sempre foi assim. Durante o início da evolução da Terra, e da vida sobre ela, sabe-se que não existia oxigénio e que quando este apareceu talvez tenha actuado mais como um veneno do que como um modo de sobrevivência (este aspecto poderia já ter sido abordado no Tema 1 de Geologia – “A Geologia, os geólogos e os seus métodos: A Terra, um planeta em mudança” ou no Tema 2 – “A Terra, um planeta: A Terra - um planeta único a proteger”) podendo ser uma das causas de extinção de espécies de seres vivos e do aparecimento de outras. Mas o seu aparecimento trouxe benefícios àqueles que dele conseguiram tirar proveito. É o caso dos seres aeróbios que conseguem degradar os nutrientes de uma forma mais eficaz, sendo o oxigénio um interveniente final do processo metabólico e havendo obtenção de uma maior quantidade de energia metabólica por parte do ser vivo. Os alunos recordariam o processo de metabolismo oxidativo dando-se maior ênfase à cadeia de transporte de electrões. O professor abordaria que ao longo dos processos metabólicos se produzem moléculas que podem ser tóxicas para os organismos pelo que é necessário que sejam transformadas noutras menos nocivas ao organismo. A formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS – Reactive Oxygen Species) é uma das consequências do metabolismo oxidativo sendo o sistema catalase um dos processos de eliminação do peróxido de hidrogénio (espécie reactiva de oxigénio que se pode formar ao longo da cadeia de transporte de electrões). A catalase desdobra o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio que são inofensivos ao organismo. Por outro lado os alunos identificariam a catalase como uma enzima podendo servir como ponto de partida para relembrar alguns conceitos sobre enzimas, sua forma de actuação e o modo como a sua actividade pode ser afectada.

No início da aula prática o professor deverá pedir aos alunos que identifiquem a reacção que vão observar e que a escrevam identificando o substrato, a enzima e os produtos resultantes. De seguida o professor propunha a utilização de catalase extraída da batata uma vez que a reacção seria visualizada através da subida de disco de fibra de vidro a qual ocorreria devido à degradação do peróxido de hidrogénio pela catalase, daí

resultando água e oxigénio. Este ficaria retido entre as fibras do disco e fá-lo-ia subir à superfície. A proporcionalidade existente entre o tempo que o disco demora a subir e a quantidade de oxigénio resultante da degradação do peróxido de hidrogénio pela catalase permite obter repostas relativas ao efeito dos factores em causa sobre a actividade da enzima (catalase). Conforme a turma o professor pode optar por fazer o homogeneizado de batata na aula, juntamente com os alunos, ou tê-lo já previamente preparado explicando como foi feito.

Seria proposto que testassem a acção de alguns factores sobre a actividade enzimática: efeito da concentração da enzima, efeito da concentração do substrato, efeito da temperatura, efeito do pH, efeito da acção de um inibidor e comparação das actividades enzimáticas entre batatas submetidas ou não a stress. Por motivos de tempo de duração das actividades propostas a melhor opção seria dividir a turma por grupos dando a cada um, um teste diferente a realizar. A cada grupo seria distribuído um protocolo correspondente ao teste a realizar com a enzima devendo ser registados os resultados obtidos.

Nesta aula final de 45 min os grupos exporiam os seus resultados de forma a toda a turma os poder registar. Os alunos iriam reunir esses resultados e identificar de que forma a actividade enzimática é afectada por cada um dos factores e o que isso representa. O professor analisaria com os alunos os resultados e o seu significado. Posteriormente o professor pediria aos alunos que realizassem um relatório onde apresentariam os resultados sob a forma gráfica havendo, desta forma, uma aplicação transversal de conteúdos apreendidos em outras disciplinas. Seria ainda pedido um pequeno trabalho de pesquisa sobre a importância do estudo das ROS para a saúde humana.

Como resultado da realização deste conjunto de actividades os alunos poderão ter um conhecimento mais integrado do metabolismo e de como ele reage de modo a proteger os organismos.

## **Protocolo II: FACTORES QUE AFECTAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE**

### **A. Introdução**

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é um bioproducto tóxico, resultante de reacções metabólicas, que pode danificar as células se não for removido. O extracto de batata crua é usado como fonte de catalase para catalizar a quebra do peróxido de hidrogénio em água ( $H_2O$ ) e oxigénio ( $O_2$ ). Nesta experiência utilizar-se-ão filtros Whatman como suporte da enzima cuja actividade se pretende medir. O oxigénio resultante da reacção fica retido nas fibras do filtro provocando a sua ascensão até à superfície. O tempo (t), em segundos, desde que o disco toca na solução, mergulha e regressa novamente à superfície é registado para se calcular a taxa de actividade enzimática (R), onde  $R=1/t$ .

### **B. Objectivo**

O tempo que demora a acumular oxigénio suficiente em pequenos discos para flutuar é usado para determinar a velocidade desta reacção. Vão ser investigados os efeitos da concentração do substrato e da enzima, da temperatura, do pH e de situações de stress (aplicado ao 10º ano).

### **C. Material**

Peróxido de hidrogénio, 10%, frio, em frascos castanhos

Peróxido de hidrogénio, 1 %, frio, em frascos castanhos

Metilhidroxilamina, 10%, em frasco contagotas

Água destilada à temperatura ambiente

Batatas novas e batatas grelhadas

Caixas para gelo

Balança

Caixas plásticas para guardar as batatas

Copos de 50 ml de forma alta

Pipetas Pasteur

Copos de Blenders refrigerados até serem usados

Blenders para homogeneizar as batatas

Conta gotas

Papel de filtro, 5.5 cm

Filtros Whatman 2,1 cm de fibra de vidro, em caixas de Petri.

Pinças finas para manusear os discos

Parafilm

Tesoura, faca

Pipetas de 1 ml e 10 ml

Pró-pipetas ou pi-pump

Cronómetro

Termómetros

Banhos-maria (a 30 e a 37 °C)

Placa de aquecimento

Provetas graduadas de 100ml e 10 ml

## D. Procedimento

### D.1. Extracção da catalase

- Descascar uma batata fresca e cortá-la em pequenos cubos. Pesar 50 gr destes cubos de batata.
- Num copo de homogeneização, previamente arrefecido, colocar 200 ml de água desionizada fria e os 50 gr de batata
- Homogeneizar a grande velocidade durante 3 x 10 segundos.

**Nota:** A partir deste ponto o homogeneizado de enzima deve ser mantido em gelo.

- Filtrar o extracto de batata para uma proveta graduada de 250 ml (se possível arrefecida). Adicionar água desionizada fria levando ao volume final de 250 ml. Agitar bem. Este extracto deverá ser marcado arbitrariamente como contendo 100 unidades de enzima por ml (100 unid./ml) e será usado nos testes 1 a 5.

### D.2. Efeito da concentração da enzima

- Marcar 4 copos de 50 ml e preparar 40 ml de enzima conforme indicação do quadro 1:

**Quadro 1**

Tubo	Enzima	Água destilada fria	Unidades/ml
1	4 ml *	0 ml	100
2	3 ml	1 ml	75
3	2 ml	2 ml	50
4	0 ml	4 ml	0

\* preservar este tubo de enzima não diluída para testes posteriores

- Manter as diluições da enzima em gelo.
- Marcar 8 copos (em duplicado) para o substrato com a indicação das unidades de enzima.
- Colocar, em cada um dos copos, 40 ml de solução de peróxido de hidrogénio a 1%.
- Encharcar um disco de fibra de vidro com solução de catalase (250 ml). Deixar que o disco absorva a solução de enzima; escorrer se houver excedente.
- Deixar cair o disco no primeiro copo (com a solução de peróxido de hidrogénio). O disco mergulhará rapidamente na solução.
- Medir o tempo (t), em segundos, desde que o disco toca na solução até que regressa novamente à superfície.
- Registar os dados no quadro 2.

Quadro 2

Enzima (unid./ml)	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa $R=1/t$
	1º copo	2º copo	Soma	Média	
100					
75					
50					
0					

- Construir um gráfico da actividade enzimática: Concentração da enzima (eixo dos x) vs taxa de reacção (eixo dos y).

### D.3. Efeito da concentração do substrato

- Para determinar o efeito da concentração do substrato na actividade enzimática marcar 16 copos com as seguintes concentrações (duplicado): 0%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1%, 5% e 10% de peróxido de hidrogénio.
- Preparar 40 ml de solução de peróxido de hidrogénio diluído à concentração indicada em cada copo conforme o quadro 3.

Quadro 3

Concentração do substrato	Vol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 1% (ml)	Vol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 10% (ml)	Água desionizada (ml)
0 %	----	----	40
0.1 %	4	----	36
0.2 %	8	----	32
0.5 %	20	----	20
0.8 %	32	----	8
1 %	40	----	0
5 %	----	20	20
10 %	----	40	0

- Esperar que as soluções de substrato atinjam a temperatura ambiente antes de iniciar a reacção.
- Encharcar os discos de fibra de vidro com solução de enzima 100U/ml (250µl).
- Deixar mergulhar os discos em cada copo com a respectiva concentração de solução de substrato.

- Registar os resultados no quadro 4. Repetir a experiência para cada substrato e determinar a taxa de actividade, R.

**Quadro 4**

Concentração do substrato	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa $R=1/t$
	1º copo	2º copo	Soma	Média	
0%					
0.1 %					
0.2 %					
0.5 %					
0.8 %					
1.0 %					
5.0 %					
10.0 %					

- Construir um gráfico da actividade enzimática: Concentração do substrato (eixo dos x) vs taxa de reacção (eixo dos y).

#### D.4. Efeito de um inibidor enzimático

A metilhidroxilamina liga-se ao átomo de ferro que faz parte da molécula de catalase e deste modo interfere na formação do complexo enzima-substrato.

- Preparar os seguintes tratamentos:
  - Com enzima (100U/ml) e sem hidroxilamina (1ml de extracto enzimático);
  - Com enzima (100 U/ml) e com hidroxilamina (adicionar 5 gotas de hidroxilamina a 10% a 1ml de extracto enzimático e deixar actuar durante 1 min);
  - Sem enzima e com hidroxilamina (controlo – 1 ml de água desionizada e 5 gotas de hidroxilamina a 10%).
- Marcar 6 copos (em duplicado) com tratamentos acima descritos.
- Deitar em cada copo 40 ml de peróxido de hidrogénio a 1% (substrato).
- Encharcar os discos as soluções dos tratamentos descritos (250µl)
- Mergulhar os discos nos copos respectivos.
- Medir o tempo e registar os dados no quadro 5; determinar R.

Quadro 5

Tratamento	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa $R=1/t$
	1º copos	2º copos	Soma	Média	
c/ Enz s/ Hidr					
c/ Enz c/ Hidr					
s/ Enz c/ Hidr					

### D.5. Efeito da temperatura

Neste procedimento vai ser testado o efeito da temperatura na actividade enzimática fazendo com que a reacção ocorra a diferentes temperaturas tais como: 4, 15 temperatura ambiente (22), 30 e 37 °C (se usar outros valores de temperatura fazer o seu registo exacto).

- Preparar 7 copos com alíquotas de 5 ml da solução de extracto enzimático 100 unid./ml.
- Levar um copo com 5 ml de extracto enzimático à ebulição (5 min.) e prosseguir o processo fazendo a reacção ocorrer a 37 °C (Não ferver o peróxido de hidrogénio).
- Marcar 14 copos (duplicado) com a temperaturas a que irá decorrer o teste.
- Colocar 40 ml de solução de peróxido de hidrogénio a 1% em cada copo (substrato).
- A catalase e o substrato devem estar à respectiva temperatura antes de se iniciar a reacção.
- Mergulhar os discos nas enzimas às diferentes temperaturas e depois nos respectivos copos.
- Registar a temperatura e o tempo que demorou o disco a subir no quadro 6.
- Determinar R.

Quadro 6

Temperatura °C	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa $R=1/t$
	1º copo	2º copo	Soma	Média	
0					
4					
15					
Ambt. ( )					
30					
37					
Fervida (37)					

- Fazer um gráfico da actividade enzimática em função da temperatura: temperatura (eixo dos x) vs taxa de reacção (eixo dos y).

### D.6. Efeito do pH

- Marcar 5 copos de 50 ml da seguinte forma: controlo, pH4, pH6, pH8 e pH10.
- Em cada copo deitar 1 ml de enzima e 3 ml de solução tampão com o pH apropriado.
- Para o controlo usar 1 ml de enzima e 3 ml de água destilada.
- Marcar 10 copos (duplicado) com o pH respectivo.
- Usar 40 ml de solução de peróxido de hidrogénio a 1% como substrato.
- Medir a actividade da enzima da forma atrás descrita e registar os dados no quadro 7.
- Determinar R.

Quadro 7

pH	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa $R=1/t$
	1º copo	2º copo	Soma	Média	
controlo					
4					
6					
8					
10					

- Construir um gráfico representativo da variação da taxa de actividade enzimática em função do pH: pH (eixo dos x) vs taxa de reacção (eixo dos y).

### D.7. Efeito de situações de stress (para aplicação ao 10º ano)

- Colocar uma batata submersa em água durante 24 horas.
- Proceder à homogeneização como descrito em D.1. de forma a obter um extracto onde está contida a catalase.
- Marcar 2 copos de 50 ml da seguinte forma: I – Batata não submersa, II – Batata submersa
- Marcar 4 copos (duplicado) com os tratamentos realizados.
- Usar 40 ml de solução de peróxido de hidrogénio a 1% como substrato.



- Medir a actividade da enzima da forma atrás descrita e registar os dados no quadro 8.
- Determinar R.

**Quadro 8**

Tratamento	Tempo para o disco flutuar (seg)				Taxa R=1/t
	1º copo	2º copo	Soma	Média	
<b>Batata não submersa</b>					
<b>Batata submersa</b>					

- Construir um gráfico de barras representativo da variação da taxa de actividade enzimática nos dois tratamentos: Tratamentos (eixo dos x) vs taxa de reacção (eixo dos y).

## Actividade III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

### Tópicos

#### Inserção curricular no 12º Ano

**Disciplina de Biologia:** Unidade 5 – Produção de Alimentos e Sustentabilidade

**Disciplina de Área Projecto:** Apresentando esta actividade como tema de exploração.

**Justificação:** O mercado de enzimas passou de 400 milhões de dólares americanos em 1983 para um bilião, em 1995. Grandes quantidades de enzimas são utilizadas nas indústrias de lacticínios (coagulantes), de detergentes, de panificação, cerveja, amido e têxteis. O aumento da população mundial principalmente em zonas de fraca produtividade primária, e a instabilidade do clima tornam a engenharia enzimática aplicada à área alimentar muito aliciante como fonte alternativa de alimento. Mas para se poder usar as enzimas é necessário compreender o seu modo de actuação, que factores os afectam e que parâmetros se devem controlar para uma produção industrial eficiente.

#### Objectivos:

- # Compreender que as enzimas são biocatalisadores indispensáveis ao metabolismo celular.
- # Conhecer factores que afectam a actividade enzimática.
- # Compreender o modo como os factores físico-químicos afectam as enzimas
- # Compreender os modelos de actuação enzimática.
- # Compreender a especificidade enzima-substrato.
- # Compreender o conceito de via metabólica.
- # Reconhecer a importância dos estudos de cinética enzimática para a indústria /biotecnologia
- # Realizar actividades com aquisição de destreza no manuseamento do material de laboratório

### Aplicação na aula

A catalase é uma enzima. Este seria o tema de desenvolvimento desta actividade tendo como objectivo a resposta a algumas questões: O que é uma enzima?, Como é o seu mecanismo de actuação?, O que é que pode afectar a actividade catalítica de uma enzima?, Como é que esta enzima específica actua?, Qual a importância dos estudos cinéticos de enzimas? Em biotecnologia, onde é que são utilizadas enzimas?

O espaço temporal requerido para o desenvolvimento desta actividade seria de 90'(TP) + 90'(P) + 90' (TP).

O professor poderia iniciar a actividade apresentando questões sobre a natureza das enzimas, sua estrutura, modo de funcionamento e factores que afectam a sua actividade catalítica. A explicação aos alunos da importância de estudos de cinética e do seu significado permitiria introduzir conceitos como a constante de Michaelis ( $K_M$ ), velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) e transformação de Lineweaver-Burk.

Na aula prática seria distribuído aos alunos um protocolo que visa testar a influência de um factor sobre a actividade da catalase. Se possível, os alunos fariam os cálculos e preparariam previamente as soluções durante as aulas de Físico-Química pelo que já compreenderiam qual a reacção em causa e que reagentes seriam necessários. Também o processo de análise deveria ser já do conhecimento dos alunos pois faz parte dos conteúdos lectivos de Físico-Química. Os factores a estudar seriam: Efeito da concentração da enzima, Efeito da concentração do substrato, Efeito da temperatura, Efeito do pH, Efeito da acção de inibidores e Variação da taxa de actividade da enzima com o tempo.

Os alunos seriam divididos em dois turnos e cada um deles em grupos, cabendo a cada grupo o estudo do efeito de um factor (6 factores corresponderiam à formação de 6 grupos de trabalho por turno). Proceder-se-ia à realização do protocolo distribuído, ao registo dos dados obtidos e à realização dos cálculos necessários.

Em aula seguinte os grupos exporiam os resultados obtidos para registo por parte de toda a turma. Seria explicado como se procederia para o cálculo da constante de Michaelis ( $K_M$ ) e do  $V_{máx}$  assim como o seu significado em termos práticos. Com ajuda de software apropriado seriam construídos gráficos dos resultados obtidos e proceder-se-ia à linearização de Lineaweaver-Burk (que permite comparar, de uma forma mais simples, a cinética de várias enzimas). Seria ainda possível fazer o estudo da actividade da enzima na presença de inibidores (KCN neste caso) identificando casos de inibição competitiva ou não competitiva em função da variação dos parâmetros cinéticos.

Após a compreensão destes parâmetros o professor apresentaria alguns casos de aplicação de enzimas em biotecnologia e da importância do estudo da cinética enzimática para a produção industrial de enzimas ou de produtos resultantes de reacções catalisadas por elas.

No final os alunos fariam um relatório da actividade experimental e um pequeno trabalho de pesquisa sobre a aplicação de enzimas em biotecnologia.

No **Anexo C** é fornecida alguma informação geral sobre enzimas, que poderá ser útil quer a professores quer a alunos. Deste modo, pretendeu-se sistematizar alguns conceitos sobre enzimas que pudessem ser úteis para a exploração das actividades propostas.

### **Protocolo III: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA CATALASE E ESTUDO DA CINÉTICA**

#### **A. Introdução**

A catalase é uma enzima presente em todos os tipos de mamíferos principalmente no fígado, rins e glóbulos vermelhos. Catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) resultante do metabolismo celular libertando oxigénio ( $\text{O}_2$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma substância extremamente tóxica e é altamente reactiva podendo causar a oxidação de constituintes celulares, principalmente lípidos, podendo causar a morte celular. A catalase ao degradar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  desempenha um papel importante na protecção contra este agente metabólico.

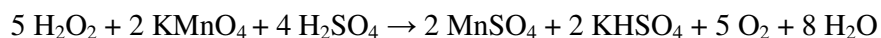
A catalase apresenta um alto poder catalítico, podendo uma molécula de enzima decompor 5 milhões de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $0^\circ\text{C}$ . Os sais de ferro simples também catalisam a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , porém a velocidade da reacção é muito lenta, podendo-se considerar negligenciável relativamente à actividade da catalase

#### **B. Objectivo**

Nesta experiência serão estudados seis factores que influenciam a actividade da catalase purificada e disponível comercialmente.

- 1 – A concentração da enzima
- 2 – A concentração do substrato
- 3 – O tempo de reacção
- 4 – A temperatura
- 5 – O pH
- 6 – A concentração de um inibidor.

A avaliação da actividade da catalase será feita determinando a quantidade de peróxido de hidrogénio não decomposto. A adição de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) vai baixar o pH destruindo a enzima e interrompendo a reacção. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanescente será titulado com permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ), de acordo com a seguinte reacção:



## C. Material

Solução concentrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5M

Solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de trabalho 0,1M (diluir cinco vezes a solução concentrada com tampão fosfato pH 7,0 )

Solução stock de catalase 0.4mg/ml

Solução de trabalho de catalase 0.04mg/ml (diluir 10 vezes a solução stock com tampão fosfato pH 7.0) Tampão fosfato 10 mM, pH 7.0

Tampão fosfato 50 mM, pH 7.0

Tampão citrato 50 mM, pH 3.0

Tampão ftalato 50 mM, pH 5.0

Tampão TRIS ou borato 50 mM, pH 9.0

Solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M

Solução de  $\text{KMnO}_4$  0,05 M

Solução de KCN 1mM

Copos de vidro ou erlenmayers

Bureta

Pipetas 1ml, 5ml e 10 ml

Agitador magnético

Cronómetro

Banho termostaticado

Gelo granulado

## D. Procedimento

### D.1. Influência da concentração da enzima

- Pipetar 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M em cada um dos tubos conforme o discriminado no quadro 1.
- Adicionar, de 30 em 30 segundos, a solução de enzima conforme o indicado no quadro. Agitar imediatamente.
- Exactamente 5 min após, juntar 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Titular toda a série de ensaios, tubo 1 ao 6, com  $\text{KMnO}_4$  até surgir coloração vermelha clara permanente. Registrar os resultados obtidos e representar graficamente os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio destruído como função do volume de enzima utilizado.

Quadro 1

Tubo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Enzima (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)
1	10	0	10			
2	10	0.25	10			
3	10	0.50	10			
4	10	0.75	10			
5	10	1.00	10			

### D.2. Influência do tempo de reacção

- Preparar uma série de 5 tubos de acordo com o discriminado no quadro 2.
- Ao recipiente 1 adicionar 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Agitar. Acrescentar 1 ml de enzima. Tem-se assim o controlo tempo zero.
- Ao recipiente 2 pipetar 1 ml da enzima e, após 1 minuto exacto, interromper a reacção com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Conduzir os outros ensaios como o anterior, mas interrompendo a reacção após 3, 5 e 10 min, respectivamente.
- Realizar as titulações com KMnO<sub>4</sub>.
- Registar os resultados obtidos e calcular os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio decomposto por minuto. Representar graficamente a quantidade de peróxido destruído e a velocidade de reacção ao longo do tempo.

Quadro 2

Tubo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Enzima (ml)	Tempo (min)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído/min (mmol)
1	10	1	0				
2	10	1	1				
3	10	1	3				
4	10	1	5				
5	10	1	10				

### D.3. Influência da temperatura

- Preparar uma série de 8 tubos com 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  conforme o quadro 3.
- Colocar dois tubos a 37 °C, dois a 10°C, dois a 25 °C e os restantes em gelo a 0 °C.
- Preparar 4 tubos com 5 ml de enzima e colocar cada um às temperaturas referidas anteriormente.
- Deixar os tubos até equilíbrio térmico antes de iniciar a reacção.
- Determinar a actividade da catalase usando 1.0 ml da preparação enzimática. Incubar durante 5 min. Interromper a reacção com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Realizar as titulações com  $\text{KMnO}_4$ .
- Registar os resultados obtidos e calcular os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio decomposto por minuto. Representar graficamente.

**Quadro 3**

Tubo	Temp. (°C)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ml)	Enzima (ml)	$\text{KMnO}_4$ (ml)	$\text{KMnO}_4 \text{ i} - \text{KMnO}_4 \text{ f}$ (ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ destruído (mmol)
1	0	10	0			
2	0	10	1			
3	10	10	0			
4	10	10	1			
5	25	10	0			
6	25	10	1			
7	37	10	0			
8	37	10	1			

### D.4. Influência do pH

- Preparar soluções de peróxido ajustadas aos seguintes valores de pH: pH 3, pH5, pH 7 e pH 9, respectivamente em tampão 50mM de ftalato, citrato, fosfato e TRIS.
- Marcar uma série de 8 tubos e colocar 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  conforme o quadro.
- Colocar 1ml da enzima nos tubos indicados no quadro.
- Interromper a reacção ao fim de 5 min com 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Titular todas as amostras com  $\text{KMnO}_4$ .
- Registar os resultados obtidos e calcular os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio destruído em cada pH. Representar graficamente.

Quadro 4

Tubo	pH	Enzima (ml)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)
1	3.0	1.0			
2	3.0	0.0			
3	5.0	1.0			
4	5.0	0.0			
5	7.0	1.0			
6	7.0	0.0			
7	9.0	1.0			
8	9.0	0.0			

### D.5. Influência da concentração do substrato

- Preparar uma série de 8 tubos de acordo com o discriminado no quadro 5.
- Adicionar, de 30 em 30 segundos, a solução de enzima conforme o indicado no quadro. Agitar imediatamente.
- Após 5 min exactos, interromper a reacção juntando 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Titular toda a série de ensaios, tubo 1 ao 8, com KMnO<sub>4</sub> até surgir coloração vermelha clara permanente.
- Registar os resultados obtidos e representar graficamente os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio destruído como função da concentração de substrato utilizado.
- Introduzir os dados obtidos no software GraphPad Prism 4 e obter os parâmetros cinéticos. Proceder à linearização de Lineaweaver-Burk e interpretar o gráfico obtido.

Quadro 5

Tubo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Enzima (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)
1	10	0.0	0.0	10			
2	10	0.0	1.0	10			
3	7.5	2.5	0.0	10			
4	7.5	2.5	1.0	10			
5	5	5.0	0.0	10			
6	5	5.0	1.0	10			
7	2.5	7.5	0.0	10			
8	2.5	7.5	1.0	10			



### D.6. Influência do inibidor KCN

- Preparar 4 tubos com 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pH 7.0.
- Adicionar com cuidado 1ml de KCN 1mM ao tubo 2.
- Adicionar 0.1 ml de KCN ao tubo 3.
- Pipetar 1ml da enzima nos tubos 2, 3 e 4 conforme indicado no quadro.
- Interromper a reacção ao fim de 5 min com 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Titular todas as amostras com  $\text{KMnO}_4$ .
- Registar os resultados obtidos e calcular os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio destruído em cada pH. Representar graficamente.

**Quadro 6**

Tubo	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ml)	KCN 1 mM	Enzima (ml)	$\text{KMnO}_4$ (ml)	$\text{KMnO}_4$ i – $\text{KMnO}_4$ f (ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ destruído (mmol)	Inibição %
1	10	0.0	0.0				
2	10	1.0 ml	1.0				
3	10	0.1 ml	1.0				
4	10	0.0	1.0				

### D.7. Estudo da cinética enzimática na presença de inibidores (KCN)

- Pipetar 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1M em cada um dos tubos conforme o discriminado nos quadros 7 e 8.
- Adicionar, de 30 em 30 segundos, a solução de enzima conforme o indicado no quadro. Agitar imediatamente.
- Exactamente 5 min após, juntar 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Titular toda a série de ensaios, tubo 1 ao 6, com  $\text{KMnO}_4$  até surgir coloração vermelha clara permanente.
- Registar os resultados obtidos para cada concentração de inibidor e representar graficamente os miliequivalentes de peróxido de hidrogénio destruído como função da concentração de substrato utilizado.
- Introduzir os dados obtidos no software GraphPad Prism 4 e obter os parâmetros cinéticos. Proceder à linearização de Lineaweaver-Burk e interpretar os gráficos obtidos.
- Identificar o tipo de inibição causada pelo cianeto sobre a actividade da catalase.

Quadro 7

Tubo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	KCN 1mM (ml)	Enzima (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)
1	10	1	0	10			
2	10	1	0	10			
3	10	1	0.25	10			
4	10	1	0.50	10			
5	10	1	0.75	10			
6	10	1	1.00	10			

Quadro 8

Tubo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	KCN 1mM (ml)	Enzima (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> (ml)	KMnO <sub>4</sub> i – KMnO <sub>4</sub> f (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destruído (mmol)
1	10	0.1	0	10			
2	10	0.1	0	10			
3	10	0.1	0.25	10			
4	10	0.1	0.50	10			
5	10	0.1	0.75	10			
6	10	0.1	1.00	10			



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



As três actividades apresentadas na primeira parte da dissertação foram optimizadas de modo a poderem ser realizadas nas escolas dos ensinos Básico e Secundário, com aplicação a vários níveis de ensino e com diferentes graus de dificuldade. Cada actividade pode ser inserida nos respectivos conteúdos curriculares, permitindo fazer a ligação com conceitos teóricos actualizados e apelativos, muitas vezes não mencionados nos referidos currículos.

A primeira actividade (Actividade I) - *Estudo do estado de oxidação-redução dos complexos respiratórios da cadeia de transporte de electrões*- apresenta um maior grau de complexidade pelo que a sua implementação deve ser dirigida para a disciplina de Área Projecto do 12º ano, a qual permitirá fazer uma exploração mais demorada e cuidada do tema. Foi optimizada com o cuidado de colocar situações que os alunos consigam atingir tendo em conta o seu nível de aprendizagem.

As actividades II - *Factores que afectam a actividade enzimática da catalase* e III - *Determinação da actividade da catalase e estudo da cinética enzimática*, consistem em metodologias simples, exequíveis no espaço escolar e fáceis de serem compreendidas pelos alunos. Permitem, ainda, a exploração de conceitos relacionados com o stresse oxidativo (e doenças associadas) e com a biotecnologia enzimática, que são aspectos que certamente surpreenderão e motivarão os alunos.

Os protocolos que constituem a segunda parte da dissertação apresentam-se de um modo sistematizado de modo a facilitar a sua aplicação por parte do professor e a respectiva execução por parte do aluno. Algumas das metodologias propostas pretendem tirar partido de infra-estruturas que algumas escolas possuem e que não têm sido utilizadas no contexto da biologia. Por outro lado permite também chamar à atenção para protocolos exequíveis que podem ser implementados por rotina dando uso real a equipamentos muitas vezes “empacotados” anos a fio (caso de espectrofotómetros que existem já em número apreciável de escolas sem que deles seja retirado qualquer proveito).

Finalmente considera-se que tanto a introdução a esta dissertação como alguns dos anexos podem constituir material de consulta fácil que ajude a desenvolver

competências ao nível científico e técnico de forma a poder acompanhar novos conceitos e técnicas experimentais que, com o evoluir das ciências em geral e da biologia em particular, surgem nos currículos escolares.

## **BIBLIOGRAFIA**





Abe, K., Nakino, N. e Anan, F.K.. (1979). pH dependendy of kinetic parameters and reaction mechanism of beef liver catalase. *Journal of Biochemistry*, 85(2): 473-479.

<http://jb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/85/2/473>

Adams, M. J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G.C., Hackert, M. L., Liljas A., Rossmann, M.G., Smiley, I. E., Allison, W.S., Everse, J., Kaplan, N. O. e Taylor, S. S.. (1973). Structure-Function Relationships in Lactate Dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci*. 70(7): 1968–1972.

<http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=4146647>

Almeida, A.M. (2001). Educação em Ciências e Trabalho Experimental: Emergência de uma nova concepção. In *Ensino Experimental das Ciências*. A. Veríssimo A. Pedrosa e R. Ribeiro (Coord.). Ministério da Educação. Lisboa.

Arteca, R.. (1997). Flooding, in M. Prasad (ed.), *Plant Ecophysiology*, p. 151-172. Wiley. New York.

Barrientos, A., Kenyon, L. e Moraes, C.T.. (1998). Human xenomitochondrial cybrids – Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *J. Biol. Chem.* 273: 14210-14217.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. e Stryer, L.. (2002). **Biochemistry** (5<sup>th</sup> Edition). W.H. Freeman and Company. New York.

Cadenas, E.. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 79-110.

Cadenas, E. e Davies, K.J.. (2000). Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 29: 222-230.

Campos, L.S.. (2002). *Entender a Bioquímica*, 3<sup>a</sup> Edição. Escolar Editora, Lisboa.

Carpenter, R.. (2001). Mannella: Fractal-like Structure of Mitochondria. *Fractals In Biology*. Santa Fe Institute. [http://discuss.santafe.edu/biofractals/discuss/msgReader\\$8](http://discuss.santafe.edu/biofractals/discuss/msgReader$8)

Clark, J.M. e Switzer, R.L.. (1977). **Experimental Biochemistry** (2<sup>nd</sup> Edition). H. Freeman and Company, New York.

Dalle-Donne, I., Rossib, R., Giustarinib, D., Milzania, A. e Colomboa, R.. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329: 23 –38.

Dekock, P.C., Hall, A. e Inkson, R.H.. (1979). A study of Peroxidase and Catalase distribution in the potato tuber. *Annals of Botany*, 43: 295-298.

DES (Departamento do Ensino Secundário), (1998). *Proposta de Revisão Curricular – Ensino Secundário*. Ministério da Educação, Lisboa.

Devlin, T.M.. (1997). **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation** (4<sup>th</sup> Edition). Wiley-Liss, USA.

Fagan, J., Slecza, B. G. e Sohar, I.. (1999). Quantitation of Oxidative Damage to Tissue Proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 751-757.

Fridovich, I.. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97-112.

Garrett, R.H. e Grisham, C.M.. (1995). **Biochemistry**. Saunders College Publishing, New York.

Ghadermarzi, M. e Moosavi-Movahedi, A.A.. (1996). Determination of the kinetic parameters for the “suicide substrate” inactivation of bovine liver calatase by hydrogen peroxide. *J. EnzymeInhib.*, 10(3): 167-175.

Ghadermarzi, M. e Moosavi-Movahedi, A.A.. (1997). The effects of temperature and pH on the kinetics of reactions between catalase and suicide substrate hydrogen peroxide. *Italian Journal of Biochemistry*, 46(4): 197-205.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=9541866&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9541866&dopt=Abstract)

Gonzalez, M.J.. (1992). Lipid peroxidation and tumor growth: an inverse relationship.

*Med. Hypotheses*, 38: 106-110.

Greenway, H. e Gibbs, J.. (2003). Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Functional Plant Biology*, 30(10) 999 – 1036. <http://www.publish.csiro.au/paper/PP98096.htm>

Grigorieff, N.. (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J. Mol. Biol.*, 277, 1033-1046.

Halliwell, B. e Gutteridge, Jonh M.C.. (1999). **Free radicals in biology and medicine** (3<sup>th</sup> Edition). Oxford University Press, London.

Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D. e Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.*, 278: 5557-5563.

Hartman, H., Kester, D., Davies, F. e Geneve, R.. (1997). **Plant Propagation: Principles and Practices** (6<sup>th</sup> Edition). Prentice –Hall, New Jersey.

Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A., e Harris, D.L.. (1991). *Biochemistry*, 30:3576.

Jezek, P. e Hlavatá, L.. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 2478-2503.

Kimbrough, Doris R., Magoun, Mary Ann, Langfur, Meg. (1997). A Laboratory Experiment Investigating Different Aspects of Catalase Activity in an Inquiry - Based Approach. *Journal of Chemical Education*, 74: 210  
<http://jchemad.chem.wisc.edu/Journal/Issues/1997/Feb/abs210.html>

Kirkman, H.N. e Gaetani, G.F.. (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl. Acad. Sci.*, 81: 4343-4347.

Lardinois, O.M., Mestdagh, M.M. e Rouxhet, P.G.. (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1295(2): 222-238.

Lehuédé, J., Fauconneau, B., Barrier, L., Ourakow, M., Piriou, A. e Vierfond, J.-M., (1999). Synthesis and Antioxidant Activity of New Tetraarylpyrroles. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 34: 991-996.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. e Darnell, J.. (2003). **Molecular Cell Biology** (5<sup>th</sup> Edition). W.H. Freeman and Company, New York.

Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Muraru, II, Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K. e Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBM Life*, 52(3-5): 93-100.

Marques, Miguel. (2004). **14 Actividades Laboratoriais para o Ensino da Biologia**. Porto Editora, Porto.

Mayer, D., Naumann, R., Edler, L. e Bannasch, P.. (1990). Investigation by amperometric methods of intracellular reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol in normal and transformed hepatocytes in the presence of different inhibitors of cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2;1015(2):258-63.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=2297512&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2297512&dopt=Abstract)

Nelson, D.L. e Cox, M.M.. (2005). **Lehninger – Principles of Biochemistry**, 4<sup>rd</sup> Edition, Worth Publ., New York.

Nordberg, J. e Arnér, Elias S.J.. (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*, 31 (11): 1287-1312.

Ogura, Y. e Yamazaki, I.. (1983). Steady-state of the catalase reaction in the presence of cyanide. *Journal of Biochemistry*. 94 (2):403-408.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=6630165&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6630165&dopt=Abstract).

Ottosson, J.E.A. e Bakul, C.D.. (2004). Use of a chemical reaction for mechano-optical signal transduction. *Sensors and Actuators B* 97 (2004) 198–201, Elsevier. [http://www.science.siu.edu/chemistry/dave/newwww/published\\_papers/dave.mechano.sensact.pdf](http://www.science.siu.edu/chemistry/dave/newwww/published_papers/dave.mechano.sensact.pdf).

Ribeiro, S.M., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C., Costa, N.M., Matta, S.L. e Queiroz, M.E.. (2005). A formação e os efeitos das espécies reactivas de oxigénio no meio biológico. *Biosci. J.*, 21(3): 133-149.

Roberts, J.K.; Callis, J.; Jardetzky, O.; Walbot, V.; Freeling, M.. (1984). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81(19): 6029–6033.

<http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=6592598>

Roger, A.J., Svard, S.G., Clark, C.G., Smith, M.W., Gillin, F.D. e Sogin, M.L.. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 229–234

.

Scheffler, I.E.. (2001). Mitochondria make a come back. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 49:3-26. Elsevier Science. [www.elsevier.com/locate/drugdeliv](http://www.elsevier.com/locate/drugdeliv)

Stadtman, E.R. e Levine, R.L.. (2000). Protein Oxidation. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 899:191-208.

Taipa, M. A. e Gama, M.. (2003). Estrutura e função dos enzimas. In Cabral, J.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. (Coord.) - **Engenharia enzimática**. Edições Lidel, Lisboa. pp.13-66.

Tribe, M. e Whittaker, P.. (1972). **Chloroplasts and Mithochondria**. Studies in Biology nº 31. Edward Arnold Publishers, London.

Trindade, H., Karmali, A e Pais, M.S.. (1988). One-step purification and properties of catalase from leaves of *Zantedeschia aethiopica*. *Biochimie*, 70(12):1759-64.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=3150680&query hl=1&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=3150680&query hl=1&itool=pubmed_docsum)

Turrens, J.F.. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 522.2: 335-344. <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/552/2/335?ck=nck>

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. e Mazur, M.. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.

Yoruk, I.H., Demir, H., Ekici, K. e Savran, A.. (2005). Purification and Properties of catalase from Van Apple (Golgen Delicious). *Pakistan Journal of Nutrition* 4(1): 8-10.

Zhiyong, W., Cunxin, W., Songsheng, Q.. (2000). Microcalorimetric studies on catalase reaction and inhibition of catalase by cyanide ion. *Thermochimica Acta*, 360:141-146.

#### **Sites consultados:**

- [1] [www.cropsci.uiuc.edu/.../form-function.cfm](http://www.cropsci.uiuc.edu/.../form-function.cfm)
- [2] [http://www.biology.ualberta.ca/courses/genet601/uploads/fall02\\_and\\_winter03/seminars/a1\\_and\\_b1/genet\\_prof/public/seminars/24\\_Rebecca\\_Taylor\\_March\\_13\\_2003.pdf](http://www.biology.ualberta.ca/courses/genet601/uploads/fall02_and_winter03/seminars/a1_and_b1/genet_prof/public/seminars/24_Rebecca_Taylor_March_13_2003.pdf)
- [3] [http://discuss.santafe.edu/biofractals/discuss/msgReader\\$8](http://discuss.santafe.edu/biofractals/discuss/msgReader$8)
- [4] <http://www.dmargineantu.net/daci/PDH-GFP.pdf>
- [5] <https://notes.utk.edu/bio/bcmb421.nsf/f5b2cbf2a827c0198525624b00057d30/d223ffc90d983512852565130068b671?OpenDocument>
- [6] <http://www.xtal.tsinghua.edu.cn/research/complexII.html>
- [7] <http://www.bio.brandeis.edu/faculty01/grigorieff.html#top>
- [8] [courses.cm.utexas.edu/.../Lecture-Ch19-1.html](http://courses.cm.utexas.edu/.../Lecture-Ch19-1.html)
- [9] <http://www.aecom.yu.edu/home/biophysics/rousseau/cco/cytcx.htm>
- [10] [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1530408100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1530408100)
- [11] <http://www2.ufp.pt/~pedros/anim/2frame-iv.htm>

- [12] [www.hgsc.bcm.tmc.edu/~pburch/thesis.pdf](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/~pburch/thesis.pdf)
- [13] [www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/.../willy3.jpg](http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/.../willy3.jpg)
- [14] <http://www.science-projects.com/catalasekinetics.htm>
- [15] [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_IV/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/cassylab\\_kat-e.htm](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/cassylab_kat-e.htm)
- [16] <http://www.miniweb.com.br/Ciencias/Artigos/Apoptose1.html>
- [17] <http://mipwww.life.uiuc.edu/403%20Labs/Lab%20%23%209-Resp%20II%20Heart/Heart30304.pdf>
- [18] <http://www.biochem.oulu.fi/studies/laboratorioharj/BKIerillisohjeet.pdf>
- [19] <http://www.colby.edu/chemistry/BC368/laboratory/Experiment%203.pdf>
- [20] [www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-12/6-nichol/6-nichol.htm](http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-12/6-nichol/6-nichol.htm)
- [21] <http://www.uac.pt/~barreto/medicina/AULA%2014%20fracc%20celular%20introd.pdf>
- [22] <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitopoisons.html>
- [23] <http://www.med.unibs.it/~marchesi/oxphos.html>
- [24] <http://jb.asm.org/cgi/content/full/181/24/7580>
- [25] <http://www.biochem.oulu.fi/studies/laboratorioharj/BKIerillisohjeet.pdf>
- [26] <http://www-saps.plantsci.cam.ac.uk/records/rec291.htm>
- [27] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DenaturingProtein.html#chaperone>
- [28] <http://www.edvotek.com/pdfs/282.pdf>
- [29] [http://www.courseworkhelp.co.uk/A\\_Level/Chemistry/3.htm](http://www.courseworkhelp.co.uk/A_Level/Chemistry/3.htm)
- [30] <http://www.virtualsciencefair.org/2006/cheu6j2/factors.html>
- [31] [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_IV/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/cassylab\\_kat-e.htm](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/cassylab_kat-e.htm)
- [32] <http://www.chemeng.mcmaster.ca/courses/che3bk3/Lecture%205.pdf>
- [33] [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_IV/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/chembox\\_urease-e.htm](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/chembox_urease-e.htm)
- [34] [http://www.seas.upenn.edu/courses/belab/LabProjects/2005/Enzyme\\_Kinetics\\_of\\_Alkaline\\_Phosphatase.ppt#276,13,Discussion](http://www.seas.upenn.edu/courses/belab/LabProjects/2005/Enzyme_Kinetics_of_Alkaline_Phosphatase.ppt#276,13,Discussion)
- [35] <http://www.mpassociates.gr/software/catalog/sci/enzymekinetics.html>





**ANEXOS**



## ANEXO A. CÁLCULO DO TEOR DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DESTRUÍDO

A avaliação da actividade enzimática é feita determinando a quantidade de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) não decomposto. A reacção é interrompida adicionando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanescente é titulado com KMnO<sub>4</sub> de acordo com a seguinte reacção:



### Cálculos:

Partindo de um exemplo é apresentado o modo como se pode determinar o número de moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruídas na reacção e, indirectamente, a actividade da enzima.

Volume de KMnO<sub>4</sub> 50 mM gasto para titular o volume de 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 M sem enzima – 8,24 ml.

Volume de KMnO<sub>4</sub> 50 mM gasto para titular o volume de 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 M após 5 min de actuação da enzima – 3,38 ml (é proporcional à quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanescente após a actuação da enzima).

A diferença entre os volumes gastos na titulação dos 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 M sem enzima e após a actuação da enzima é proporcional à quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruída:

$$8,24 - 3,38 = 4,86 \text{ ml de KMnO}_4 \text{ 50 mM}$$

Se existem	50 mmol de KMnO <sub>4</sub>	-----	1000 ml
	X	-----	4,86 ml
	X = 0,243 mmol de KMnO <sub>4</sub>		

A estequiometria da reacção mostra que são necessárias 2 moles de KMnO<sub>4</sub> para titular 5 moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logo

5000 mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-----	2000 mmol KMnO <sub>4</sub>
X	-----	0,243 mmol

$$X = 0,6075 \text{ mmol H}_2\text{O}_2 \text{ destruído}$$



## ANEXO B. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

### E.1. Percentagem de massa de soluto / volume da solução

Aplica-se na preparação de uma solução a X% de uma dada substância que se encontra no estado sólido.

Prepara-se dissolvendo X g dessa substância num solvente (água destilada ou outro) para um volume final de 100 ml.

### E.2. Percentagem de volume de soluto / volume de solução

Aplica-se na preparação de soluções mais diluídas realizadas a partir de uma outra solução mais concentrada da mesma substância.

Prepara-se medindo X ml dessa substância num solvente (água destilada ou outro) para um volume final de 100 ml ou através da aplicação da seguinte fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$C_1$  – Concentração da solução padrão  
 $V_1$  – Volume a calcular  
 $C_2$  – Concentração da solução pretendida  
 $V_2$  – Volume da solução pretendida

### E.3. Molaridade a partir de um soluto sólido

Uma solução molar (M) contém uma mole de substância (molécula-grama) dissolvida num litro de água.

Aplica-se na preparação de uma solução X molar a partir de um soluto em pó.

Necessita-se saber o peso molecular da substância o qual corresponderá a um mole.

Supor que uma substância X tem como peso molecular 200.00g.

Se se dissolver 200.00g dessa substância num litro de água obtemos uma solução 1M.

Para preparar uma solução mais ou menos concentrada tem que se fazer uma proporção:

Ex: Solução 0.5M

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Se} & 200.00\text{g} & \text{-----} 1 \text{ mol} \\
 & X & \text{-----} 0.5 \text{ mol}
 \end{array}
 \qquad X=100.00\text{g}$$

Para preparar a solução tem que se dissolver 100.00g de soluto em 1000 ml de solvente.

#### E.4. Molaridade a partir de um soluto líquido impuro.

Aplica-se na preparação de uma solução X molar a partir de um soluto líquido e que não é puro.

Necessita-se saber o peso molecular da substância, a densidade e o grau de pureza.

Supor que uma substância X tem como peso molecular 90.08g, uma densidade de 1,21kg/l e uma grau de pureza de 90%.

Ex: Preparar 10 ml de uma solução X a 90mM

$$M = n/\text{vol (L)} \quad 90 \times 10^{-3} = n/0.01 \quad n = 0.0009 \text{ mol}$$

$$\begin{array}{ccc} 1 \text{ mol} & \text{-----} & 90.08 \text{ g} \\ 0.0009 \text{ mol} & \text{-----} & X \end{array} \quad X = 0.081072 \text{ g}$$

$$\begin{array}{ccc} d = 1,21 \text{ kg/l} = 1,21 \text{ g/ml} & 1 \text{ ml} \text{-----} & 1.12 \text{ g} \\ & Y \text{-----} & .081072 \text{ g} \end{array} \quad Y = 0.064 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{ccc} \text{Grau de pureza 90\%} & 0.067 \text{ ml} \text{-----} & 90\% \\ & Z \text{-----} & 100\% \end{array} \quad Z = 0.074 \text{ ml}$$

Para preparar a solução tem que se dissolver 0.074ml de soluto em 10 ml de solvente.

#### E.5. Alguns conselhos sobre preparação e conservação das soluções:

**Meio de homogeneização (meio isosmótico):** Juntar sacarose 130mM, KCL 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5mM em água desionizada. Adicionar um reagente de cada vez e deixar dissolver completamente; acertar a pH 7,1; só depois completar o volume. Preparar no dia anterior e conservar no frio.

**Solução de ácido sulfúrico:** A água desionizada deve ser adicionada lentamente, contra as paredes do balão pois a reacção que ocorre é altamente exotérmica provocando o aquecimento do balão. Deixar arrefecer antes de acertar o volume. Ter cuidado na sua preparação pois é um ácido muito forte e corrosivo.

**Solução de catalase:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no congelador em alíquotas de 5 ml.

**Solução de cianeto de potássio:** Conservar em frascos âmbar ou dividir em alíquotas de 1ml por tubos tapados com papel metalizado e bem fechados. Guardar congelado a -20°C. É um produto muito tóxico pelo que se deve usar luvas na sua preparação.

**Solução de diclorofenolindofenol (DPIP):** Preparar no dia anterior com solução tampão fosfato e conservar no frio.

**Solução de glicose:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no congelador.

**Solução de  $\beta$ -hidroxibutirato:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no frio.

**Solução de lactato:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no frio.

**Solução de piruvato:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no frio.

**Solução de succinato:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no frio.

**Solução de malato:** Prepara com solução tampão fosfato. Conservar no frio.

**Solução de malonato 0,2 M:** Tapar com papel metalizado e colocar no frio ou congelar. É um produto perigoso pelo que se deve usar luvas na sua preparação.

**Solução de  $\text{NAD}^+$ :** A solução deve ser preparada no próprio dia com solução tampão fosfato e conservar no frio até ao momento de ser utilizada.

**Soluções de peróxido de hidrogénio:** Solução aquosa; conservar no frio em frascos âmbar.

**Solução de rotenona:** Solução alcoólica. Tapar com papel de estanho e colocar no frio ou congelar. É um produto tóxico pelo que se deve usar luvas.

**Solução tampão fosfato:** Preparar uma solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM em água desionizada e acertar a pH 7,4 com KOH 3M. Conservar no frio.

**Solução tampão citrato:** Solução aquosa; acertar a pH 3.0; conservar no frio.

**Solução tampão ftalato:** Solução aquosa; acertar a pH 5.0; conservar no frio.

**Solução tampão Tris:** Solução aquosa; acertar a pH 9.0; conservar no frio.





## ANEXO C. ENZIMAS E CINÉTICA ENZIMÁTICA

### 1. Introdução histórica

A enzimologia teve um rápido desenvolvimento, considerando que os grandes progressos iniciais desta ciência tiveram lugar há relativamente pouco tempo. Até ao século XIX, admitia-se que processos como a fermentação apenas poderiam ter lugar mediante a acção de seres vivos. Assim acreditava-se que fenómenos como a fermentação alcoólica é a decomposição de matéria orgânica eram indissociáveis da actividade de células vivas. Foi apenas em 1833, que Payen e Persoz observaram que o precipitado obtido por adição de um álcool a um extracto de malte continha uma substância termolábil que convertia o amido em açúcar. Esta substância foi designada por diastase (do grego *diastasis* – separação), uma vez que tinha o poder de separar substâncias solúveis de grãos de amido insolúveis. O termo diastase veio posteriormente a ser utilizado como uma designação geral para as enzimas. Na mesma época, foi identificada uma outra substância, extraída de suco gástrico, que possuía a propriedade de digerir proteínas. Estas evidências puseram em causa a teoria, defendida entre outros por Pasteur, segundo a qual os fermentos deviam possuir células vivas (Cabral, 2003).

Segundo a teoria vitalista, as reacções químicas nos seres vivos ocorriam através de mecanismos especiais, distintos dos das reacções químicas. Berzelius, em 1835, opôs-se a essa teoria, sugerindo que a “força vital” era uma propriedade própria dos reagentes químicos. O termo enzima seria introduzido em 1878 por Kuhne (do grego *zyme* – na levedura), para referir o princípio activo vulgarmente designado na época de fermento (Cabral, 2003).

Para a designação das enzimas, Duclaux propôs em 1883 o uso do sufixo “ase” (de diastase) a acrescentar a um termo que designava a substância sobre a qual actuava a enzima. Esta é a base de um sistema de nomenclatura ainda hoje usado (Cabral, 2003).

Em 1897 a teoria vitalista foi desacreditada, com as experiências dos irmãos Buchner, que conseguiram obter um extracto de levedura livre de células e possuidor de capacidade fermentativa (Cabral, 2003, [1]). A natureza química das enzimas permaneceria, no entanto, desconhecida até 1926, data em que Sumner conseguiu purificar a enzima urase na forma cristalina. Sumner mostrou que os cristais eram de natureza proteica e, após terem sido obtidos cristais de outras enzimas nos anos 30 (pepsina, tripsina, quimotripsina), foi aceite que, de uma maneira geral, as enzimas são proteínas. A purificação de enzimas foi acompanhada da constatação da sua especificidade. Em 1945, Emil Fischer associou essa especificidade a uma certa complementaridade entre enzima e substrato, tendo desenvolvido o modelo da “chave” e “fechadura”. Um importante desenvolvimento desta ideia foi produzido por Linus Pauling, em 1948. Segundo este autor, o modo de acção dos enzimas é tal que eles possuem maior afinidade por uma espécie de transição do que pela molécula de substrato. Este conceito é ainda hoje central no entendimento do modo de acção das enzimas, e é comprovado pela obtenção de

anticorpos com propriedades catalíticas, usando como antigénio análogos da espécie de transição (Cabral, 2003).

Até aos nossos dias, foram purificados e cristalizados muitos enzimas, que de um geral são de natureza proteica, quer proteínas simples, quer proteínas associadas a grupos de natureza não proteica (co-factores). De facto, na generalidade das enzimas, as cadeias laterais dos aminoácidos, através dos seus grupos funcionais (nomeadamente os grupos carboxílico, imidazol e amina) estão associados ao mecanismo de reacção, desencadeando-a ou estabilizando espécies de transição. A natureza proteica das enzimas, além da versatilidade química e estrutural proporcionada por estas moléculas, permite também aos seres vivos exercer um controlo da actividade ao nível da regulação da expressão genética. Nos anos 80, porém, descobriram-se alguns ácidos ribonucleicos (ARN) com propriedades catalíticas (ribozimas) (Cabral, 2003).

## 2. O que são enzimas

As células vivas dos organismos heterotróficos assim como, na ausência de luz, as dos organismos autotróficos, obtêm a energia de que necessitam a partir da oxidação dos glícidos de reserva a  $\text{CO}_2$  e água. Esse conjunto de processos, como também os processos de síntese das macromoléculas, só é possível devido à intervenção dos catalisadores bioquímicos - as **enzimas** (Campos, 2002).

Embora alguns RNA sejam capazes de intervir cataliticamente na sua própria duplicação todas as enzimas são proteínas: concretamente, proteínas globulares (Campos, 2002).

As enzimas são, de entre todos os tipos de catalisadores, os mais eficientes. Enquanto um catalisador não enzimático pode aumentar entre 100 e 10.000 vezes a velocidade de uma reacção, algumas enzimas são capazes de a multiplicar por um factor  $10^{20}$ . Deste modo, a catálise das reacções bioquímicas segue uma cinética especial, embora os parâmetros fundamentais em que se baseia essa cinética sejam os mesmos dos outros processos químicos (Campos, 2002).

A energia de activação requerida para iniciar um processo químico pode ser fornecida através de uma elevação de temperatura que aumente a agitação molécula. Em bioquímica, porém, a temperatura dos sistemas não pode ultrapassar valores compatíveis com a vida dos organismos (o aquecimento provocaria, nomeadamente, a desnaturação das proteínas). É então que intervêm os catalisadores bioquímicos – enzimas - cuja função é baixar a energia de activação necessária à reacção e permitir que esta decorra velocidade muito mais elevada (Campos, 2002).

O catalisador (qualquer catalisador):

-Não modifica K (constante de equilíbrio)

- Não permite que passe a ocorrer uma reacção que não seja possível do ponto de vista termodinâmico. Terá sempre de ser  $\Delta G < 0$  (a menos que seja fornecida a energia necessária)
- Encontra-se intacto no final da reacção
- Diminui a energia de activação necessária à reacção, permitindo que esta decorra a velocidade mais elevada.

As enzimas possuem as propriedades dos catalisadores químicos e:

- Baixam ainda mais a energia de activação;
- Possuem toda a natureza proteica, o que lhes confere especificidade muito elevada;
- A sua actividade pode ser sujeita a controlo (o que é da maior importância na regulação do metabolismo celular).

As enzimas podem ser inteiramente proteicas ou constituídas por uma parte proteica (apoenzima) e uma parte não proteica ou cofactor (que pode ser iões metálicos, grupos prostéticos e coenzimas) (Campos, 2002)

O centro activo é constituído pelo conjunto de aminoácidos que entram em contacto com o substrato. Compreende o **local de fixação**, que se combina com o substrato por ligações fracas, e o **centro catalítico**, que actua sobre o substrato levando-o a sofrer a reacção química (Campos, 2000).

Nos centros catalíticos da maior parte das enzimas conhecidas é possível encontrar com muita frequência aminoácidos como a serina, a cisteína, a histidina e a lisina. Muitas enzimas hidrolíticas possuem a serina no seu centro activo (Campos, 2002).

A conformação do local de fixação modifica-se em consequência da ligação ao substrato; diz-se que este "induz" a alteração da conformação.

Nas enzimas que actuam através de um *cofactor* - que é o responsável pela transformação estrutural do substrato -, essa estrutura (trate-se de um metal, de um grupo prostético ou de uma coenzima) encontra-se ligada à enzima na vizinhança muito próxima do centro catalítico (Campos, 2000).

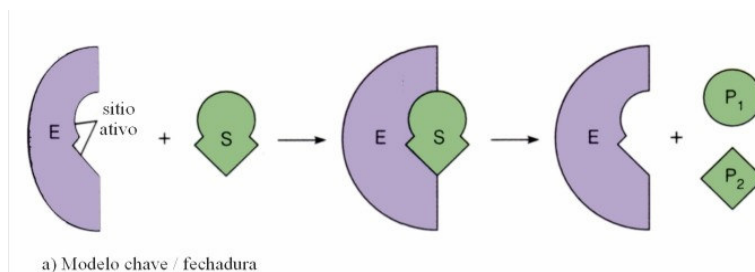
Muitas enzimas são compostas de uma cadeia polipeptídica simples. Este é caso de enzimas como a ribonuclease, lisosima, tripsina, pepsina e algumas alfa amilases. Ao contrário, existe um grande número de enzimas que são compostas por mais de uma cadeia peptídica. A enzima lactato-desidrogenase é composta por quatro cadeias polipeptídicas. A repetição das cadeias polipeptídicas na construção de uma macromolécula de proteína caracteriza a estruturação quaternária que esta pode assumir[2].

### 3. Mecanismos de acção enzimática

#### 3.1. Enzima como catalisador

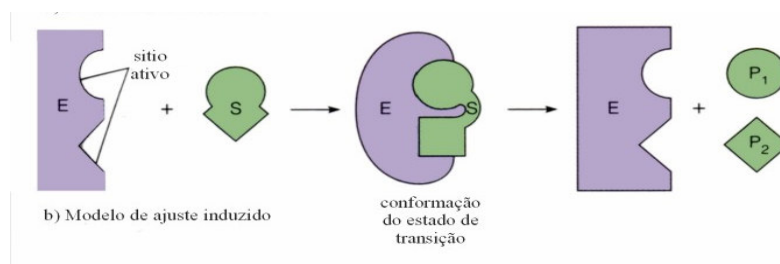
O princípio de um catalisador é diminuir a energia de activação. A enzima liga-se a uma molécula de substrato numa região específica denominada local activo. Esta região é um encaixe que apresenta uma parte constituída por cadeias de aminoácidos que ajudam a ligar o substrato, e a outra parte desta cadeia actua na catálise [2].

Em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave-fechadura para explicar a acção enzimática. Neste modelo enzima encaixa com o substrato específico no local activo que apresenta uma estrutura rígida e complementar em relação ao substrato, tal como uma chave e a respectiva fechadura.



**Figura 1 - Modelo de acção enzimática proposto por Emil Fischer**

Tanto a enzima quanto o substrato sofrem conformação para o encaixe. A enzima não aceita simplesmente o substrato, o substrato é distorcido para a conformação exacta do estado de transição, denominado encaixe por indução, proposto por Koshland (1958).



**Figura 2 - Modelo de acção enzimática proposto por Koshland**

A enzima também encontra o lado específico da cadeia posicionando no lugar exacto da ligação no processo catalítico, muitas vezes o lado da cadeia pode ser básico ou ácido promovendo a adição ou remoção de protões. Noutras circunstâncias a enzima associa-se a um ião metálico na posição correcta para a ocorrência da catálise [2].

Ao completar a reacção catalítica a enzima liberta o produto e retorna à forma original. O processo ocorre em duas etapas:



### 3.2. Inibição Enzimática

Muitos tipos de moléculas inibem as enzimas e podem agir de várias formas. A principal distinção é entre inibição reversível e inibição irreversível.

A forma que envolve ligações não-covalentes é reversível, através da remoção do inibidor. Em alguns casos as ligações não-covalentes podem ser irreversíveis sob diferentes condições fisiológicas.

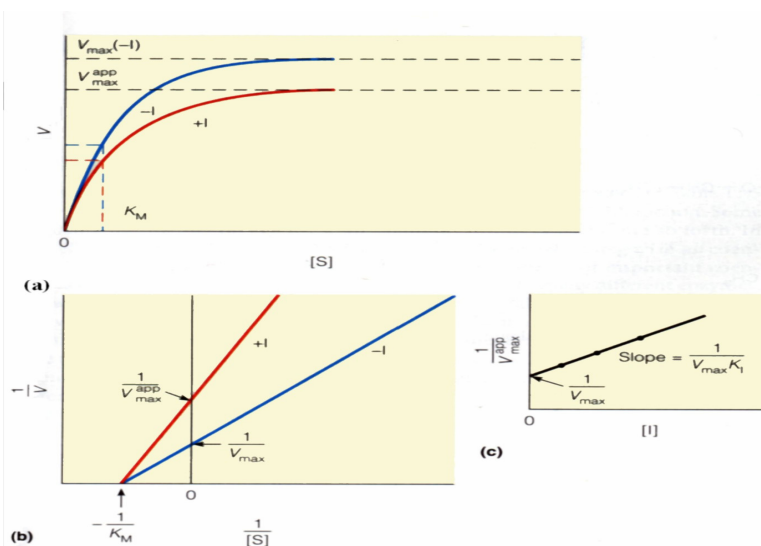
Já na inibição irreversível, a ligação molecular é covalente. São geralmente encontrados em reacções que apresentam toxinas específicas [2].

#### 3.2.1. Inibição Reversível

Existem vários modos que estão envolvidos com ligação não covalente, eles diferenciam-se quanto ao mecanismo pelo qual diminuem a actividade enzimática e como eles afectam a cinética da reacção.

**Inibição Reversível Competitiva** Uma molécula com estrutura semelhante ao substrato de uma enzima poderá ligar-se a ela no seu centro activo, mas não permite que ocorra o processo catalítico pois ocupa o centro activo do substrato correto. Portanto o inibidor compete com o substrato pelo mesmo local: o centro activo da enzima. O efeito da reacção modifica o  $K_M$ , mas não altera a velocidade.

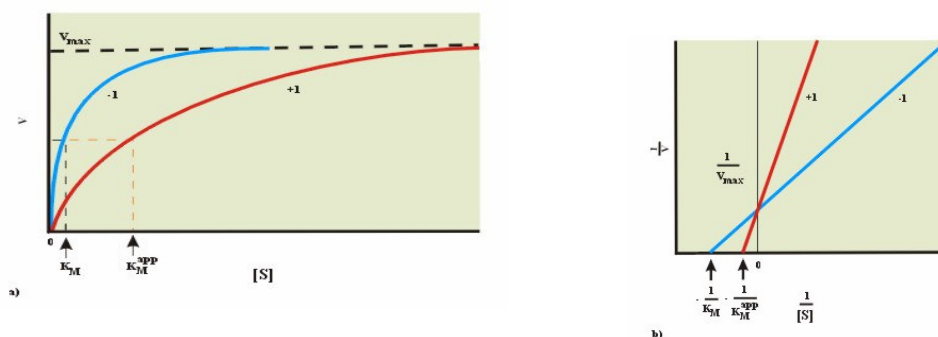
**Figura 3 – Gráfico de Michael-Menten (a) e de Lineweaver-Burk (b) mostrando o efeito de um inibidor competitivo e determinação do  $V_{\text{máx}}$ .**  
Retirado de [2]



<sup>2</sup> ES – Complexo Enzima-Substrato

**Inibidor Reversível não Competitivo** Ocorre quando uma molécula ou íão se liga num segundo local na superfície enzimática (não no centro activo). Isto pode distorcer a enzima tornando o processo catalítico ineficiente.

O inibidor não competitivo pode ser uma molécula que não se assemelha com o substrato, mas apresenta uma grande afinidade com a enzima. É o mecanismo inverso do inibidor competitivo, porque inibe a ligação do complexo ES e não da enzima livre. O efeito da reacção modifica a velocidade mas o  $K_M$  permanece constante [2].



**Figura 4 – Gráfico de Michael-Menten e de Lineweaver-Burk mostrando o efeito de um inibidor não competitivo.**

Retirado de [2]

### 3.2.2. Inibição Irreversível

Algumas substâncias ligam-se covalentemente às enzimas deixando-as inactivas. Na maioria dos casos a substância reage com o grupo funcional no centro activo bloqueando o local do substrato, deixando a enzima cataliticamente inactiva.

Inibidores irreversíveis podem ser extremamente seletivos pois são semelhantes ao substrato. São muito utilizados como resíduos, os quais apresentam grupos de átomos que se configuram de modo semelhante ao estado de transição que se ligam ao substrato [2].

### 3.3. Cofactores

Para alguns tipos de processos biológicos, apenas a cadeia protéica não é suficiente, por isso a proteína requer uma molécula denominada cofactor a qual pode ser uma pequena molécula orgânica, denominada coenzima ou um íão metálico.

Os cofactores são geralmente estáveis em temperatura alta. A catálise activa enzima-cofactor é denominada holoenzima, quando o cofactor é removido, se mantém a proteína, a qual é catabolicamente inactiva e é denominada apoenzima [2].

A molécula orgânica que se liga às enzimas para activar uma reacção, é denominada coenzima, cada tipo apresenta uma função química particular. Como exemplo, consideramos a

coenzima nicotinamida dinucleotídeo de adenina ( $\text{NAD}^+$ ). Esta molécula contém duas partes principais: a porção difostato adenosina, ligando uma ribose a uma nicotinamida. A outra porção é a parte final da molécula do NAD onde o anel de nicotinamida será imediatamente reduzido, servindo como agente oxidante. Uma reação típica que o NAD participa é na conversão do álcool em aldeídos e cetonas, o qual actua como agente oxidante.

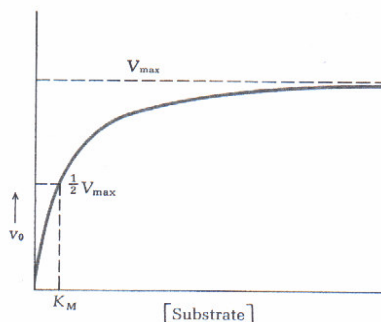
Algumas vezes é difícil distinguir uma verdadeira coenzima de um segundo substrato. Durante uma catálise, uma coenzima tem a capacidade de, através de oxi-reduções, ser reutilizada por outra enzima, voltando novamente ao ciclo metabólico. Por exemplo o NAD após a oxidação do substrato, passa a NADH, activa a reacção, deixa a enzima e novamente será oxidada por um sistema de aceitador de eletrões, voltando a ser NAD e assim podendo se ligar a outra enzima. Já um segundo substrato nunca deixa a enzima, ele é reduzido e oxidado no ciclo metabólico.

Muitas coenzimas são fortemente relacionadas com vitaminas. As vitaminas são moléculas orgânicas essenciais para o processo biológico em organismos superiores e não podem ser sintetizados por eles mesmos. Portanto estas coenzimas são essenciais aos processos metabólicos vitais dos organismos superiores.

Outra estrutura que apresenta a mesma função de coenzima, são as metaloenzimas. São enzimas que têm íons metálicos ligados covalentemente nas cadeias de aminoácidos ou em grupos prostéticos como o grupo hema. Os metais que se ligam às enzimas actuam como metais catalíticos em reacções hidrolíticas e outros com agentes redutores [2].

#### 4. Cinética enzimática

Os princípios gerais da cinética das reacções químicas aplicam-se às reacções catalisadas enzimaticamente, embora estas também mostrem um padrão distinto que não é geralmente encontrado nas reacções não enzimáticas: saturação com o substrato [2].



**Figura 5 – Efeito da concentração do substrato na velocidade de reacção**

Retirado de [2]



No gráfico é possível observar o efeito da concentração do substrato na taxa de uma reacção catalisada por uma enzima. A concentrações de substrato muito baixas, a velocidade inicial de reacção  $V_0$  é quase proporcional à concentração do substrato e a reacção diz-se de primeira ordem em relação ao substrato. Entretanto, à medida que a concentração do substrato aumenta, a taxa inicial passa a crescer menos, deixando de haver essa proporcionalidade em relação à concentração do substrato. Nessa zona, as ordens das reacções estão misturadas. Com o posterior aumento na concentração do substrato, a taxa de reacção torna-se essencialmente independente da concentração do substrato e aproxima-se assintoticamente de uma taxa constante. Nesses valores de concentrações de substrato a reacção é de ordem zero em relação ao substrato e a enzima é considerada como estando saturada com o substrato [2].

Todas as enzimas apresentam o efeito da saturação, embora variem consideravelmente no que diz respeito à concentração requerida para produzi-lo. Esse efeito de saturação levou alguns investigadores a estabelecerem a hipótese de que enzima e substrato reagem reversivelmente para formar um complexo, passo essencial na catálise de uma reacção [2].

Em 1913 a teoria da acção e cinética enzimática foi desenvolvida por dois cientistas chamados L. Michaelis e M. L. Menten, na qual uma reacção enzimática pode ser expressa pela seguinte equação, considerando-se apenas um substrato:



As moléculas do substrato passam por uma série de formas geométrica e eletricamente alteradas antes de formarem produtos da reacção e a energia livre destes intermediários, especialmente aquelas que se encontram em estados de transição mais instáveis, são os mais determinantes para a taxa de reacção. As enzimas têm maior afinidade por estes estados de transição do substrato do que têm por formas mais estáveis. Como esta interação baixa a energia destes estados de transição críticos, as enzimas podem acelerar uma determinada reacção [2]

Muitas das reacções bioquímicas que são termodinamicamente espontâneas (onde há uma diminuição da energia livre) dão-se a velocidades desprezáveis. Desta forma, as enzimas, por aceleração de velocidades reaccionais, organizam o grande número de reacções permitidas termodinamicamente entre os compostos bioquímicos de um organismo, originando um determinado metabolismo (conjunto de vias metabólicas). Nesse sentido são as velocidades e não as diferenças de energia livre que traçam o rumo do metabolismo bioquímico [1].

A partir do modelo de reacção proposto por estes pesquisadores, desenvolveu-se uma equação que nos permite demonstrar como a velocidade de uma reacção varia em função da concentração do substrato, a qual está a seguir descrita:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta equação relaciona a velocidade ( $V_0$ ), a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) e a concentração inicial de substrato com a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ). O  $K_M$  de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima. Para reações que envolvem um substrato é expressa em moles por litro e é independente da concentração da enzima. O quadro 1 relaciona algumas enzimas e seus respectivos  $K_M$ .

Quadro 1 - Valores de  $K_M$  de algumas enzimas

Enzima	Substrato	$K_m$ (mM)
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
Hoxoquinase	Glicose	0,15
	Frutose	1,5
Quimiotripsina	N-benzotirosinamida	2,5
	N-formiltirosinamida	12,0
	N-acetiltirosianamida	32
	Gliciltirosinamida	122
Anidrase carbônica	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	9,0
Glutamato desidrogenase	Glutamato	0,12
	α-cetoglutarato	2,0
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	57
	NAD <sub>ox</sub>	0,025
	NAD <sub>red</sub>	0,018
Aspartato aminotransferase	Aspartato	0,9
	α-cetoglutarato	0,1
	Oxalacetato	0,04
	Glutamato	4,0

Quadro retirado de [2]

Pode-se observar pelo quadro apresentado que os valores de  $K_M$  não são fixos, podendo variar com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura. Para enzimas que actuam em mais de um substrato, cada substrato tem um  $K_M$  característico [2].

A constante de Michaelis-Menten de uma enzima é, portanto, uma característica muito importante e fundamental, não apenas matematicamente na determinação da velocidade da reação catalisada como também na avaliação da actividade e na purificação das enzimas nos tecidos [2].

Na cinética química estudam-se velocidades de reacções químicas. Além disso, recorre-se a outros estudos que permitem atingir um objectivo geral, que é chegar a um mecanismo reaccional plausível, que descreva, em detalhe, as espécies intermediárias transientes que intervêm na reacção entre os reagentes e produtos.

Uma vez medida a velocidade da reacção, o passo seguinte consiste no estabelecimento de uma lei cinética, ou seja na obtenção de uma expressão matemática que mostre como é que a velocidade medida depende das concentrações dos reagentes (e produtos, se a reacção inversa ocorrer com velocidade apreciável).

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram uma teoria quantitativa de cinética enzimática que ainda hoje é utilizada (geralmente é referida como cinética de Michaelis-Menten). As enzimas podem realizar até vários milhões de reacções catalíticas por segundo; para determinar a velocidade máxima de uma reacção enzimática, aumenta-se a concentração do substrato até que se atinja uma taxa constante para a formação do produto. Este valor corresponde à velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) da enzima. Quando se atinge estado, todos os locais activos da enzima estão saturados com o substrato. Contudo,  $V_{\text{máx}}$  é somente um parâmetro cinético em que os bioquímicos estão interessados. A quantidade de substrato necessária para alcançar um determinado índice também é de interesse. Este pode expressar-se pela constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), que é a quantidade de substrato necessária para que uma enzima possa alcançar metade da sua velocidade máxima. Cada enzima tem um  $K_M$  característico para um dado substrato. Uma vez que  $V_{\text{máx}}$  não se pode medir directamente,  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  são determinados geralmente por extrapolação a partir de um conjunto limitado de dados, usando aquilo que se conhece como um duplo recíproco, o diagrama de Lineweaver-Burk [1].

A eficácia de uma enzima pode ser expressa em termos de  $K_{\text{cat}}/K_M$ . A quantidade  $K_{\text{cat}}$ , também designada número de turnover, inclui as constantes para todos os passos da reacção, e é o producto de  $V_{\text{máx}}$  pela concentração total da enzima.  $K_{\text{cat}}/K_M$  é uma quantidade útil para comparar enzimas, ou a mesma enzima com diferentes substratos, poque tem em consideração a afinidade e a capacidade catalítica. O máximo teórico para  $K_{\text{cat}}/K_M$  é de cerca de  $10^8$  a  $10^9$   $(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$ . Neste ponto qualquer colisão da enzima com o substrato resultará em catálise. Algumas enzimas, tal como a fumarase, aproximam-se deste limite [1].

**Significado da constante de Michaelis ( $K_M$ ).** No mecanismo de Michaelis-Menten, ou em casos semelhantes,  $K_M$  é igual à constante de dissociação do complexo enzima-substrato ( $K_M = K_S$ ). Para alguns fins,  $K_M$  pode ser considerado como uma constante de dissociação aparente; é possível, por exemplo, calcular a concentração da enzima livre em solução  $[E]$  a partir da relação:

$$[E] [S] / \sum [ES] = K_M$$

onde [ES] representa a soma de todas as espécies que contêm a enzima ligada (Cabral, 2003). Pequenos  $K_M$  significam ligações fortes; altos  $K_M$  significam ligações fracas [3].

**Significado da constante catalítica ( $K_{cat}$ ).**  $K_{cat}$ , o número de turnover, é o número de moléculas de substrato que é convertido em produto por molécula de enzima por unidade de tempo, quando a enzima está saturada com substrato. Os valores de  $K_{cat}$  variam desde menos de 1/seg. até muitos milhões por seg. [3].

**Significado de  $V_{máx}$ .** Corresponde à velocidade máxima teórica mas que nunca é atingida na realidade. Para atingir  $V_{máx}$  é necessário que todas as moléculas da enzima estejam fortemente ligadas ao substrato.  $V_{máx}$  é assintoticamente atingido conforme o substrato aumenta [3].

## 5. Classificação e nomenclatura das enzimas

Em estudos de enzimologia, não se poderiam analisar correctamente os resultados obtidos se não fosse possível definir exactamente as enzimas que são utilizadas. Actualmente são conhecidos vários milhares de enzimas diferentes e não é viável o uso exclusivo de nomes triviais para a sua identificação. Em 1961, a Comissão para Enzimas (*Enzyme Commission-EC*) da União Internacional de Bioquímica (IUB), estabeleceu uma classificação e nomenclatura de enzimas (e de co-enzimas). Desde então, têm sido publicados regularmente aditamentos e revisões (Cabral, 2003).

A EC dividiu as enzimas em 6 classes, de acordo com a reacção catalizada. Cada enzima possui um número de código, consistindo em 4 elementos, precedido das letras EC (*Enzyme Commission*). O 1º dígito indica a classe a que a enzima pertence, como se segue:

### Quadro 1 - Classificação das Enzimas segundo a Comissão de Enzimas\*

<p>1. <i>Oxido-redutases</i> (reacções de oxidação-redução ou transferência de electrões – <i>Desidrogenases e Oxidases</i>)</p> <p>1.1.actua em CH-OH</p> <p>1.2.actua em C=O</p> <p>1.3.actua em C=O-</p> <p>1.4.actua em CH-NH<sub>2</sub></p> <p>1.5.actua em CH-NH-</p> <p>1.6.actua em NADH, NADPH</p>
<p>2. <i>Transferases</i> (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – <i>Quinases e Transaminases</i>)</p> <p>2.1.grupos com um carbono</p> <p>2.2.grupos aldeído ou cetona</p> <p>2.3.grupos acil</p> <p>2.4.grupos glicosil</p> <p>2.7.grupos fosfatos</p> <p>2.8.grupos contendo enxofre</p>

<p>3. <i>Hidrolases</i> (reações de hidrólise de ligação covalente - <i>Peptidases</i>)</p> <p>3.1. ésteres</p> <p>3.2. ligações glicosídicas</p> <p>3.4. ligações peptídicas</p> <p>3.5. outras ligações C-N</p> <p>3.6. anidridos ácidos</p>
<p>4. <i>Liases</i> (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amónia e gás carbónico – <i>Dehidratases</i> e <i>Descarboxilases</i>)</p> <p>4.1. =C=C=</p> <p>4.2. =C=O</p> <p>4.3. =C=N-</p>
<p>5. <i>Isomerases</i> (reações de interconversão entre isómeros ópticos ou geométricos - <i>Epimerases</i>)</p> <p>5.1. racemases</p>
<p>6. <i>Ligases</i> (catalisam reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP- <i>Sintetases</i>)</p> <p>6.1. C-O</p> <p>6.2. C-S</p> <p>6.3. C-N</p> <p>6.4. C-C</p>

\* Quadro retirado de [2]

Os dígitos seguintes referem-se respectivamente à sub-classe, à subsubclasse e finalmente ao ordenamento das enzimas dentro de cada categoria. A definição da subclasse e da subsubclasse relacionam-se com os grupos químicos envolvidos na reacção. A Comissão definiu também recomendações relacionadas com a nomenclatura das enzimas. Assim, além do nome trivial, cada enzima deve possuir um nome sistemático incluindo o nome do substrato ou substratos, seguida de uma palavra terminada em “ase” indicando a natureza da reacção (oxido-redutase, transferase, etc.). Por exemplo, a enzima com o nome trivial glucocinase, que catalisa a fosforilação da flucose na posição 6, possui o código EC2.7.1.2, e o nome sistemático ATP:D-Glucose 6-fosfotransferase (Cabral, 2003).

## Bibliografia

- Cabral**, J.M.S., Aires-Barros, M.R. e Gama, M. (coord). (2003). Engenharia Enzimática. Lidel – Edições Técnicas, Lisboa.
- Campos**, Luís S. (2002). Entender a Bioquímica. 3ª Edição. Escolar Editora, Lisboa

Sites consultados:

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>
- [2] <http://www.ciagri.usp.br/~luagallo/Enzimas2.htm>
- [3] [http://www.people.virginia.edu/~cmg/notes/chapter\\_14.rtf](http://www.people.virginia.edu/~cmg/notes/chapter_14.rtf)

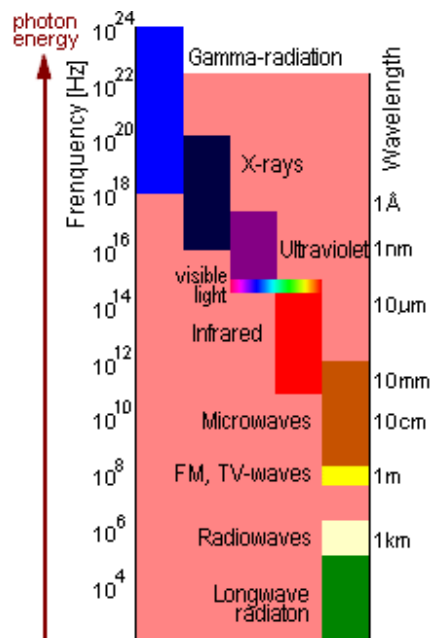
## ANEXO D. ALGUNS DADOS SOBRE ESPECTROFOTOMETRIA

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na absorção e/ou emissão de radiação electromagnética por muitas moléculas, quando os seus electrões se movimentam entre níveis energéticos. A espectrofotometria baseia-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o **ultravioleta** e o **infravermelho** (Fig. 1).

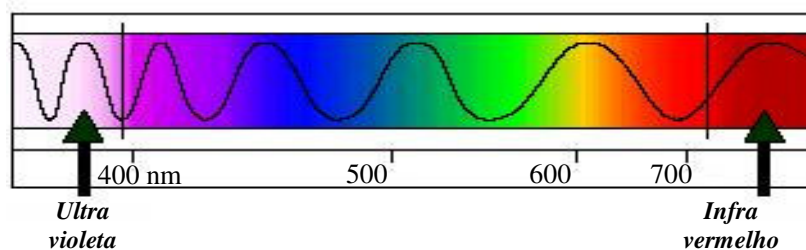
**Figura 1 - Espectro electromagnético.**

A espectrofotometria utiliza a radiação compreendida entre o ultravioleta (*ultraviolet*) e o infravermelho (*infrared*).

Retirado de [1]



A chamada radiação luminosa corresponde a uma gama de comprimentos de onda que vai desde o ultravioleta ao infravermelho no espectro da radiação electromagnética (Fig. 2).



**Figura 2 - Radiação luminosa.**Retirado de [2]

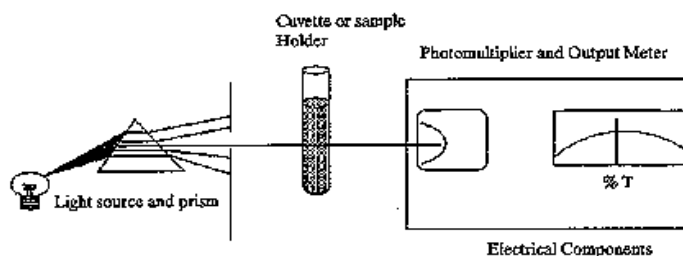
O espectro do visível está contido essencialmente na zona entre 400 e 800 nm (Quadro 1).

#### Quadro 1 - Comprimentos de onda da luz visível

Retirado de [2]

Cor	Comprimento de onda (nm)
violeta	390 - 455
azul	455 - 492
verde	492 - 577
amarelo	577 - 597
laranja	597 - 622
vermelho	622 - 780

Um espectrofotômetro é um aparelho que faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução, e mede a quantidade de luz que foi absorvida por essa solução (Fig. 3). Usando um prisma o aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda (tal como acontece no arco-íris com a separação das cores da luz branca). Pode-se assim fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromática (de um único comprimento de onda, ou quase). O espectrofotômetro permite-nos saber que quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda.



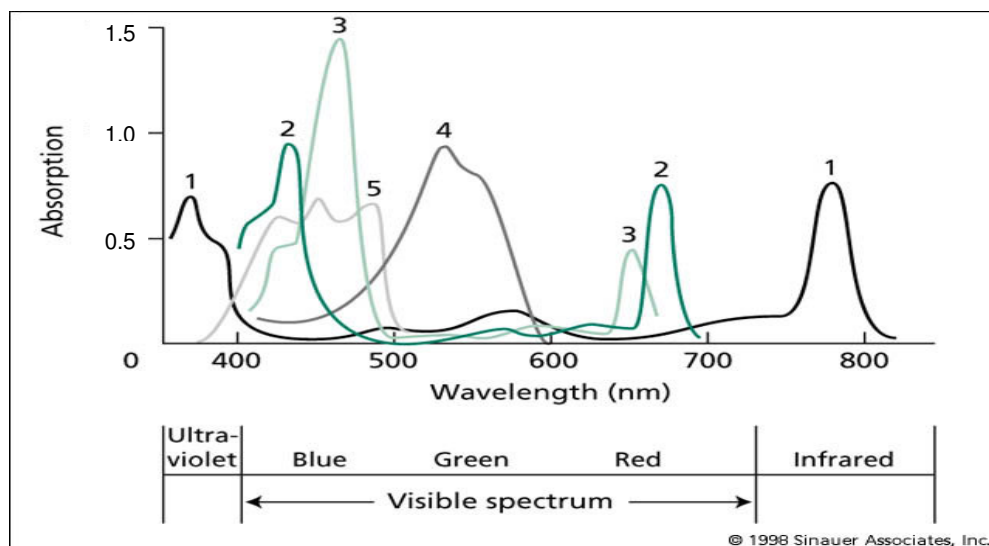
**Figura 3 - Espectrofotômetro.** A luz é dividida em feixes de diferentes comprimentos de onda por meio de um prisma óptico e passa através da amostra, contida numa *cuvette* ou célula de espectrofotômetro.

Retirado de [1]

#### Espectros de absorção

O conjunto das absorvâncias aos vários comprimentos de onda para um composto chama-se **espectro de absorção** e varia de substância para substância. Se uma substância é verde, por exemplo, então deixa passar ou reflecte a cor nesse comprimento de onda,

absorvendo mais a luz na região do vermelho. A seguir podem ver-se espectros de várias substâncias diferentes (Fig. 4).

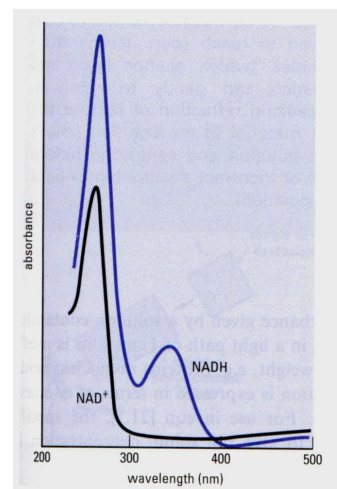


**Figura 4 - Espectros de absorção de diferentes substâncias** (1: bacterioclorofila; 2: clorofila a; 3: clorofila b; 4: ficoeritrobilina; 5: beta-caroteno). A substância 1, por exemplo, absorve pouco na região do visível, logo deve ser praticamente incolor para os nossos olhos.

Retirado de [1]

Uma vez que diferentes substâncias têm diferentes padrões de absorção, a espectrofotometria permite-nos, por exemplo, identificar substâncias com base no seu espectro. Permite também quantificá-las, uma vez que a quantidade de luz absorvida está relacionada com a concentração da substância.

Às vezes uma substância, quando alterada quimicamente, pode passar a apresentar um espectro de absorção diferente. Quando isto acontece, é possível detectar essas mesmas alterações. Por exemplo, o NADH reduzido absorve a 340 nm, enquanto que a forma oxidada não tem absorvância significativa a esse comprimento de onda (Fig. 5).



**Figura 5 - Espectros de absorção do NAD<sup>+</sup> e do NADH.**

Retirado de [1]

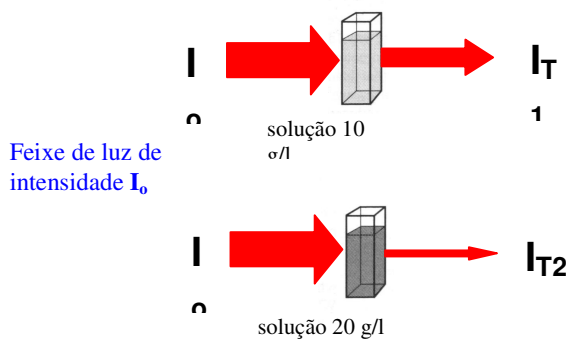


Essas diferenças de espectro podem ser utilizadas laboratorialmente para seguir o percurso de reacções que se esteja a estudar, por exemplo, reacções metabólicas que envolvam a oxidação do NADH ou a redução do  $\text{NAD}^+$ .

### Espectrofotometria e quantificação

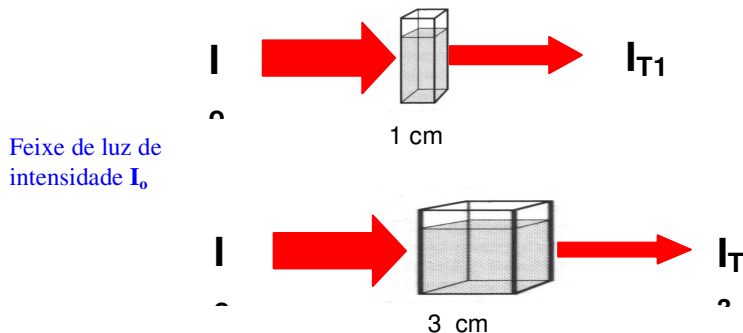
Dois princípios fundamentais descrevem o processo de absorção da luz através de uma solução (Jones *et al*, 2003):

1. A absorção da luz está exponencialmente relacionada com o número de moléculas que existem na amostra, isto é, a absorção de luz é tanto maior quanto **mais concentrada** for a solução por ela atravessada (Lei de Beer):



**Figura 6 - Relação entre a concentração de uma solução e a luz absorvida.** A solução 20g/l absorve o dobro da solução 10g/l. Retirado de [1]

2. A absorção da luz que passa através de uma solução está exponencialmente relacionada com a espessura de solução que é atravessada pela luz, isto é, a absorção da luz é tanto maior quanto maior for a distância percorrida pelo feixe luminoso através das amostras (Lei de Lambert):



**Figura 7 - Relação entre a distância percorrida pelo feixe luminoso e a luz absorvida por uma solução.** A solução contida na *cuvette* com 3 cm absorve 3 vezes mais luz que a contida na *cuvette* de 1 cm. Retirado de [1]

Combinando os princípios atrás mencionados (1 e 2), obtem-se a **lei de Beer-Lambert**:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

Diagram illustrating the Beer-Lambert Law equation  $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$  with labels:

- $A_{\lambda}$ : Absorvância ( $\lambda$  fixo)
- $\epsilon_{\lambda}$ : constante (para um  $\lambda$  fixo)
- $c$ : concentração da solução absorvente
- $l$ : distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra

Nesta equação,

$$A_{\lambda} = \log_{10} \frac{I_0}{I_T}$$

$I_0$  – luz incidente

$I_T$  – luz transmitida

$\epsilon_{\lambda}$  – coeficiente de extinção molar ao comprimento de onda  $\lambda$

$c$  – concentração da substância (em moles/l)

Normalmente usam-se *cuvettes* com 1 cm de comprimento, de modo que a equação fica:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c$$

Ou seja, a **absorvância** da luz a cada comprimento de onda  $\lambda$  é **directamente proporcional à concentração** da solução contida na *cuvette*. Esta linearidade deixa de ocorrer a concentrações muito elevadas da substância, podendo nesses casos diluir previamente a amostra a medir.

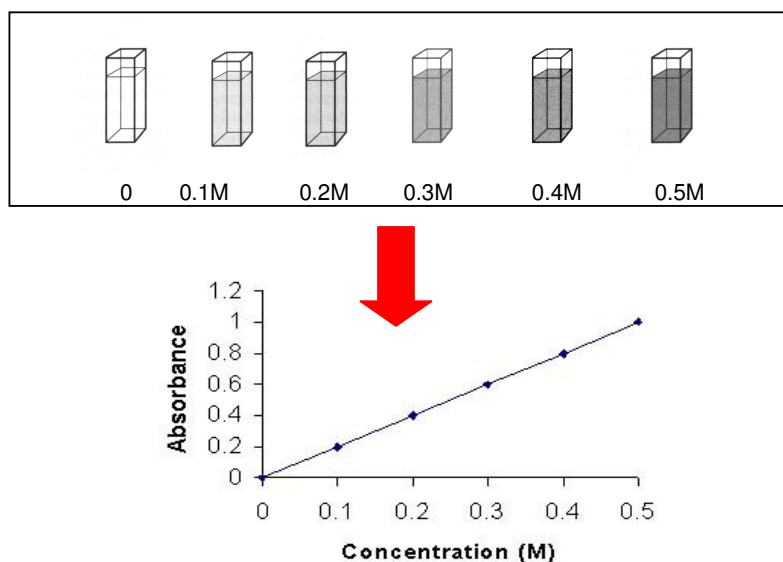
### Métodos colorimétricos

Com alguma frequência é necessário quantificar substâncias em misturas complexas, ou que não absorvem significativamente a luz a nenhum comprimento de onda. Nestes casos utilizam-se os chamados métodos colorimétricos - o composto a quantificar é posto em contacto com um reagente específico, de modo a desenvolver uma cor cuja intensidade é directamente proporcional à concentração da substância na mistura original.

Por exemplo, para quantificar proteínas numa solução pura pode medir-se a absorvância a 280 nm, sendo esta proporcional à concentração de proteína. Mas se quisermos saber a concentração de proteína num extracto impuro, este método já não pode ser utilizado, porque outras substâncias, como por exemplo os ácidos nucleicos, também absorvem a este comprimento de onda. Neste caso podemos utilizar, por exemplo, o reagente de biureto, que

reage de modo quantitativo com as proteínas, originando um complexo violeta, que absorve fortemente a radiação a 540 nm.

Para quantificar espectrofotometricamente uma substância é necessário saber o valor de  $\epsilon$ . Para isso é necessário preparar uma série de soluções do composto a quantificar, de concentração conhecida, fazê-las contactar com o reagente e medir as absorvâncias ao comprimento de onda adequado (Fig. 8).



**Figura 8 - Calibração de um método colorimétrico.** A absorvância no comprimento de onda escolhido é directamente proporcional à concentração do composto na solução.

Retirado de [1]

No exemplo da Fig. 8, há uma relação linear perfeita entre a concentração da substância (expressa em molaridade, M) e a absorvância ao comprimento de onda  $\lambda$  de medida. Podemos assim obter uma recta do tipo

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \quad (\text{ou } A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c + b \text{ caso a recta não passe na origem})$$

em que  $A_{\lambda}$  é a absorvância ao comprimento de onda  $\lambda$  de medida,  $c$  a concentração em M e  $\epsilon_{\lambda}$  a constante de proporcionalidade. Sabendo esta relação, podemos fazer corresponder uma absorvância medida a uma concentração de substância na solução a analisar.

Muitas vezes o método só é linear até uma certa concentração da substância. Nesse caso, utiliza-se a zona em que a relação é linear, diluindo a solução a medir, sempre que

necessário, de modo a que a absorvância resultante esteja contida no intervalo da recta de calibração.

**Instruções gerais de utilização do espectrofotómetro (Jones *et al*, 2003):**

1. **Ligar o aparelho e seleccionar a lâmpada correcta** (por exemplo, deutério para comprimentos de onda do UV e tungsténio para a luz visível).
2. **Esperar pelo menos 15 min antes de iniciar** as medições para a lâmpada aquecer e o aparelho estabilizar.
3. **Seleccionar o comprimento de onda desejado** (o modo de selecção do comprimento de onda depende do modelo do aparelho).
4. **Seleccionar o detector apropriado** (os aparelhos mais recentes esta selecção é automática).
5. **Inserir um branco de referência apropriado.** Os brancos de referência devem ter a mesma composição que a solução teste em tudo excepto na substância que se pretende medir, isto é, devem ter todos os reagentes excepto aquele que é pesquisado. Ter a certeza de que a cuvete é inserida no lugar correcto e com as faces polidas (transparentes) no sentido da luz.
6. **Ajustar o 0% de transmitância;** os aparelhos permitem o ajuste a zero quando, após a inserção do branco, há um valor diferente.
7. **Analisar a amostra em causa.** Substituir o branco por uma amostra da solução a testar, esperar que a leitura da absorvância estabilize (5 a 10 seg.) e anotar o valor obtido.
8. **Verificar se o aparelho se mantém calibrado** a intervalos regulares. Para tal usar o branco de referência que deve dar zero ou usá-lo para recalibrar.
9. **Verificar a reprodutibilidade do instrumento.** Medir a absorvância de uma solução simples várias vezes durante a análise; deve dar sempre o mesmo valor.

**Bibliografia:**

**JONES, A.,** Reed, R., Weyers, J. (2003). *Practical Skills in Biology*. 3th Edition. Prentice Hall.

Sites consultados:

[1] <http://www.uac.pt/~mmcosta/introd%20espectrof.doc>

(Introdução teórica sobre espectrofotometria; aulas de Bioquímica da Univ. dos Açores)

[2] <http://imagers.gsfc.nasa.gov/ems/visible.html>

(O espectro da radiação luminosa na região do visível)



## ANEXO E. ALGUNS CONCEITOS SOBRE TERMODINÂMICA

Uma das características mais marcantes nos organismos é a sua habilidade para captar, transferir, usar e armazenar energia de forma a manter a sua existência. No nosso planeta, a vida depende do fluxo contínuo de energia do Sol para a Terra. As reacções solares termonucleares produzem energia a qual é emitida para o espaço sob a forma de radiação electromagnética. Quando atingem a Terra esta energia é capturada por moléculas de clorofila presentes nas plantas verdes e bactérias fotossintéticas que a utilizam para reduzir o dióxido de carbono a carboidratos e outros compostos úteis. Somente uma pequena fracção (cerca de 0.025%) desta energia é convertida em compostos orgânicos pelos organismos fotossintéticos. Esta energia capturada conduz os processos vivos (metabolismo) de praticamente todos os organismos, unicelulares e multicelulares, invertebrados e vertebrados. Então os organismos podem ser vistos como máquinas bioquímicas que extraem energia química de compostos orgânicos por processos de catabolismo e canalizam-na para funções de sustentação de vida (Smith *et al*, 1991).

A natureza organizada e altamente estruturada dos seres vivos é, aparentemente, contraditória. Esta organização estende-se desde o nível de organismo, através do nível celular, até ao nível molecular. De facto, os processos biológicos parecem mágicos uma vez que estruturas e padrões bem ordenados emergem a partir de um mundo inanimado caótico e desordenado. Contudo, a organização visível numa célula ou numa molécula resultam de um processo biológico que está sujeito às mesmas leis físicas que os outros processos, em particular as leis da termodinâmica (Streyer, 2001).

As leis da termodinâmica distinguem entre sistema e vizinhança. Um sistema é definido pela matéria contida numa região delimitada do espaço. A matéria do resto do universo que fica fora desse espaço é designada por vizinhança. A *primeira lei da termodinâmica* estabelece que a energia total de um sistema e da sua vizinhança é constante. Por outras palavras, a energia contida no universo é constante; a energia não pode ser criada nem destruída. A energia pode tomar diferentes formas. O calor, por exemplo, é uma forma de energia. O calor é uma manifestação de energia cinética associada ao movimento aleatório das moléculas. Alternativamente, a energia pode apresentar-se como energia potencial, referindo-se à capacidade da energia ser libertada durante um processo. Considere, por exemplo, uma bola no cimo de uma torre. A bola tem uma considerável energia potencial porque, quando é libertada, a bola irá desenvolver energia cinética associada ao seu movimento de queda. Em sistemas químicos, a energia potencial está relacionada com a capacidade dos átomos reagirem uns com os outros. A primeira lei requer que qualquer energia libertada contida nas ligações químicas seja usada para quebrar outras ligações, seja libertada sob a forma de calor, ou seja armazenada sob qualquer outra forma (Streyer, 2001).

Outro conceito importante em termodinâmica é o de entropia. A entropia é uma medida do nível de desordem num sistema. A *segunda lei da termodinâmica* estabelece que a entropia total num sistema e sua vizinhança aumenta sempre num processo espontâneo. À primeira vista, esta lei parece ser uma contradição ao nosso senso comum, particularmente nos sistemas biológicos. Muitos processos biológicos, tais como a formação de uma estrutura bem definida, tal como uma folha, a partir de dióxido de carbono e outros nutrientes, claramente aumenta o nível de ordem e faz diminuir a entropia. A entropia pode diminuir localmente na formação de estruturas bem ordenadas unicamente se a entropia das outras partes do universo são aumentadas por uma quantidade igual (Streyer, 2001).

O fluxo de energia nos sistemas biológicos é mais facilmente compreendido aplicando os princípios de termodinâmica química. A termodinâmica é a ciência que visa o estudo da energia e das suas relações com a matéria. Uma reacção bioquímica constitui um processo sujeito às leis da termodinâmica. Por isso, apesar de todas as reacções metabólicas serem catalisadas por enzimas, elas só ocorrerão se forem termodinamicamente viáveis (Campos, 2002). É de referir que a diferença fundamental entre estes sistemas químicos ordinários e os sistemas bioquímicos é de que os últimos são essencialmente isotérmicos. Eles usam a energia química, e não o calor, para conduzir e manter o seu metabolismo (Smith *et al*, 1991).

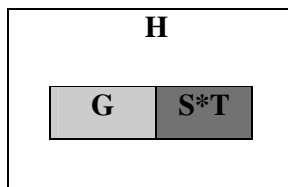
Os organismos vivos são um exemplo de sistemas de muito baixa entropia. De facto, basta atender à organização molecular, e até à própria organização celular. Por outro lado os próprios processos bioquímicos estão organizados de modo a perturbar o menos possível essa ordem: cada reacção bioquímica consiste numa transformação estrutural pequena e muito precisa, sendo que a intervenção de cada enzima é de alta especificidade; a concentração metabólica envolve a interrelação perfeitamente regulada de centenas de processos que, num balanço global, mantém praticamente constantes as concentrações celulares (Campos, 2002). No entanto, os organismos não conseguem manter eternamente um aumento da sua entropia. A destruição das estruturas celulares, órgãos e tecidos podem ocorrer durante processos de envelhecimento ou de doença e podem estar associados com um aumento correspondente de entropia no sistema; a morte do organismo consiste na última variação na entropia do sistema (Smith *et al*, 1991).

#### *Energia livre, entalpia e entropia*

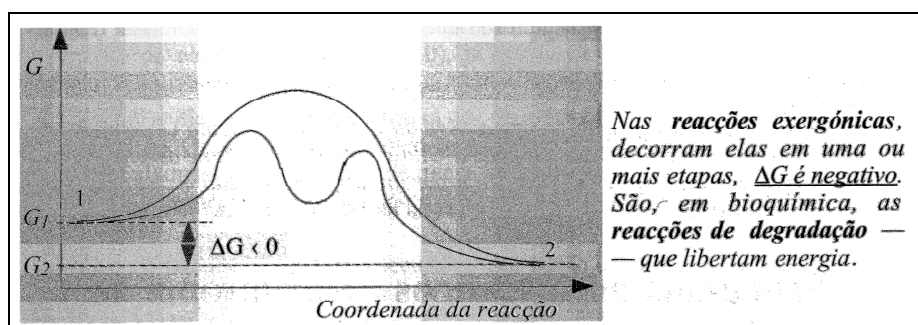
Os organismos funcionam a uma temperatura e pressão relativamente uniforme. Apenas pequenas variações na temperatura e na pressão podem ocorrer entre os vários órgãos e tecidos e quais quer diferenças não são usadas para originar reacções bioquímicas. É possível considerar que as transformações energéticas nos sistemas vivos têm lugar sob condições isotérmicas e de pressão constante (Smith *et al*, 1991). **G** é a energia que se pode libertar de um sistema que

sofre transformações a pressão constante. A energia que não se pode libertar numa transformação é igual ao produto da entropia (**S**) pela temperatura (**T**) (Campos, 2002).

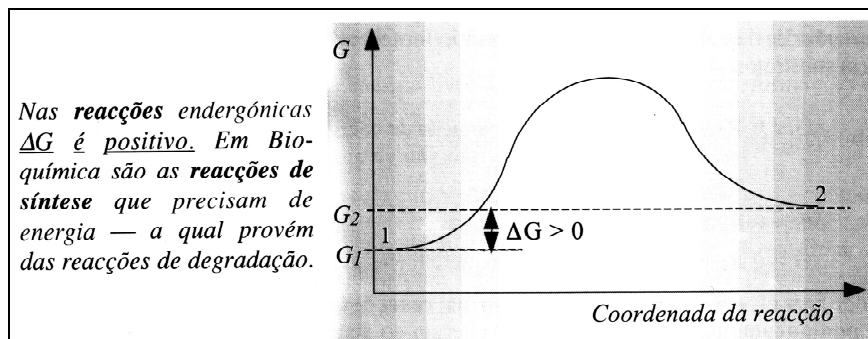
**Sistema**



Sob estas condições, é possível estabelecer uma relação simples entre estas variáveis. Mas, como estas variáveis são apreciadas através da sua variação, o que se mede é  $\Delta G$  (isto é,  $G_2 - G_1$ ). Nas reacções **exergónicas**, o sistema liberta energia: vem  $G_2 < G_1$  logo  $G_2 - G_1$  é negativo  $\rightarrow \Delta G < 0$



Mas  $\Delta G$  também pode ser positivo. Isto é, a energia livre do sistema pode aumentar, e o sistema ficar a dispor de maior energia que poderá, noutras circunstâncias, libertar. Nas reacções **endergónicas** o sistema ganha energia, logo  $G_2 > G_1$ :  $\Delta G > 0$



De um modo geral (e considerando T constante):

No estado final  $G_2 = H_2 - S_2 \cdot T$

No estado inicial  $G_1 = H_1 - S_1 \cdot T$

$$G_2 - G_1 = H_2 - H_1 - (S_2 - S_1) \cdot T$$



ou

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Relação fundamental da termodinâmica}$$

onde  $\Delta G$  é a variação de energia livre no sistema,  $\Delta H$  é a variação na entalpia,  $T$  é a temperatura absoluta a que a reacção tem lugar, e  $\Delta S$  é a variação de entropia no universo. Esta equação relaciona os dois Princípios da Termodinâmica com a energia livre (Campos, 2002).

Conforme uma reacção ou sistema tende para o equilíbrio químico, a entropia do universo aumenta sempre. Isto é designado como um valor de  $\Delta S$  positivo para todos os processos espontâneos. É também outro modo de ver a segunda lei da termodinâmica. Uma vez que o universo consiste no sistema (reacção química) mais a sua vizinhança conclui-se a partir da segunda lei da termodinâmica que a variação na entropia durante a reacção física ou química pode ocorrer no sistema ou na sua vizinhança. Nos sistemas biológicos normalmente não há variações na sua desordem interna quando metabolizam os seus nutrientes. Os organismos mantêm, e aumentam, a sua complexidade ou ordem em consequência do seu processo metabólico. Isto significa que é a entropia na vizinhança dos organismos vivos que deve aumentar durante a continuação do processo de vida. O metabolismo prossegue de forma a manter a ordem estrutural do organismo extraindo energia livre dos alimentos e libertando uma quantidade de energia inútil (principalmente calor), a qual aumenta a desordem na vizinhança. Deste modo os sistemas biológicos satisfazem a segunda lei da termodinâmica (Smith *et al*, 1991).

Embora a variação na entropia possa ser usada para prever se algum processo bioquímico pode ocorrer espontaneamente, o valor de  $\Delta S$  desse processo não é facilmente determinado. Os bioquímicos encontraram mais conveniente o uso de outra função da equação,  $G$ , como indicador da espontaneidade da reacção. As propriedades mais importantes de  $G$  para os sistemas biológicos são:

- $G$  diminui durante todos os processos espontâneos que ocorram a temperatura e pressão constantes.
- a quantidade máxima de trabalho que pode ser obtido a partir de um processo bioquímico que ocorra a temperatura e pressão constantes é dado por  $\Delta G$  do processo; isto só é verdadeiro para processos reversíveis pois o trabalho realizado é sempre menor nas reacções irreversíveis.

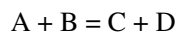
Os organismos funcionam essencialmente a temperatura e pressão constantes e a energia útil resultante das reacções bioquímicas sob estas condições designa-se energia livre,  $G$ . Esta é a forma de energia que regula o metabolismo de todos os organismos. O calor não pode ser usado pelos organismos para produzir trabalho porque o calor só produz trabalho quando passa de um sistema para outro de menor temperatura. É por esta razão que o calor é considerado uma forma

de energia inútil ao nível do metabolismo. Embora isto seja verdade, os organismos usam o calor gerado nas reacções metabólicas para manter a temperatura do corpo num nível de fora a que as reacções enzimáticas possam ocorrer a níveis apropriados (Smith *et al*, 1991).

#### *Variação de energia livre em reacções bioquímicas*

A variação de energia livre nas reacções bioquímicas pode ser calculada, dado que a variação de energia livre numa reacção está relacionada com a variação de calor (entalpia) e com a entropia. Cada reacção tem um  $\Delta G$  característico sob condições específicas – condições standard e designa-se por  $\Delta G^0$ . As condições standard são 25°C ou 298K, uma pressão de 101KPa, mantendo as concentrações de reagentes e de produtos a 1mol/l, a pH 0.0. Estas são as condições standard em química e física. Mas em reacções bioquímicas houve necessidade de ajustar o pH para 7.0 (uma vez que a maioria das reacções metabólicas ocorre a este pH) e a variação de energia livre é designada  $\Delta G^{0'}$  (Smith *et al*, 1991).

Uma definição clara de  $\Delta G^{0'}$  em reacções bioquímicas considera-a como a diferença entre as energias livres dos reagentes dos produtos sob condições standard. Usando uma reacção do tipo



$\Delta G^{0'}$  é menor que zero quando a soma das energias livres contidas em C e D é menor que a contida em A + B sob condições específicas. Uma dificuldade comum na compreensão da definição de  $\Delta G^{0'}$  deve-se ao facto de as concentrações de produtos e reagentes ser de 1mol/l. Contudo, para uma reacção com  $\Delta G^{0'} < 0$  o ponto de equilíbrio desloca-se para a direita, isto é, a concentração dos produtos será maior que a dos reagentes. Alguma confusão é trazida pela relação que se estabelece entre  $\Delta G^{0'}$  e a constante de equilíbrio ( $K'_{eq}$ ). A constante de equilíbrio da reacção (i) é do tipo

$$K'_{eq} = [C][D] / [A][B]$$

e o valor de  $\Delta G^{0'}$  é dado por

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \ln [C][D] / [A][B]$$

onde  $R$  é a constante dos gases,  $T$  a temperatura absoluta e  $\Delta G$  a variação real de energia livre na reacção. Uma vez que  $\Delta G = 0$  no equilíbrio, é possível igualar os termos do lado direito da equação a zero e escrever:

$$\Delta G^{0'} + RT \ln [C][D] / [A][B] = 0$$

logo

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln [C][D] / [A][B] \quad \text{ou} \quad \Delta G^{0'} = -RT \ln K'_{eq}$$

Então,  $\Delta G^{0'}$  é directamente proporcional ao logaritmo natural da constante de equilíbrio mas **não** é a variação de energia livre da reacção no equilíbrio. O aspecto mais importante a

referir é que nas condições bioquímicas (fisiológicas) dos organismos, não é o  $\Delta G^{\theta'}$  da reacção numa via metabólica que se torna relevante mas sim  $\Delta G$ , a variação de energia livre real sob condições fisiológicas definidas mas não standard. A equação apropriada para calcular a variação de energia livre numa reacção bioquímica é:

$$\Delta G = \Delta G^{\theta'} + RT \ln[C][D] / [A][B]$$

Então, para calcular a variação de energia livre numa reacção celular é unicamente necessário conhecer a constante de equilíbrio (geralmente disponível em livros de bioquímica) e as concentrações reais dos reagentes e dos produtos. Estas concentrações nas células vivas são geralmente da ordem dos  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  mol/l, valores muito diferentes das concentrações de 1mol/l nas condições standard. Nos sistemas biológicos as reacções podem ser conduzidas pela concentração relativa de reagentes e produtos, pelo que a equação pode indicar a direcionalidade da reacção (Smith *et al*, 1991).

Os sistemas bioquímicos raramente estão em equilíbrio. Mas, globalmente verifica-se uma situação de estabilidade que corresponde ao seguinte facto: as concentrações dos constituintes celulares e dos metabolitos intermediários mantêm-se constantes, isto é, num intervalo de tempo a velocidade de degradação de cada composto é igual à velocidade da sua formação. Muitas reacções são reversíveis e atingem o equilíbrio, isto é, a actividade das respectivas enzimas é suficientemente elevada para que o substrato seja convertido em produto à medida que é fornecido. Mas outras reacções estão muito longe de atingir o equilíbrio, devido à baixa actividade das enzimas que as catalisam. Estas reacções são, em geral, muito exergónicas e, por isso, irreversíveis nas condições intracelulares. São estas reacções que determinam a velocidade de uma sequência metabólica, e é sobre as respectivas enzimas que incide a regulação dos processos. Globalmente, reagentes e produtos são mantidos em níveis de estado estacionário que podem ser muito diferentes dos níveis de equilíbrio, e o certo é que a energia libertada ou utilizada numa reacção depende do deslocamento do sistema do ponto de equilíbrio: nenhum trabalho útil pode ser obtido quando uma reacção está em equilíbrio ( $\Delta G=0$ ): só quando prevalecem condições de não equilíbrio é que se pode obter energia a partir de uma transformação (Campos, 2002).

<p>Aguns termos importantes em termodinâmica</p>	<p><b>Sistema</b> – consiste numa porção de matéria do universo que estamos a observar; pode ser um simples átomo ou molécula reagente, uma mitocôndria, uma célula, um animal ou um planeta tão grande como Júpiter.</p> <p><b>Vizinhança</b> – refere-se ao espaço fora da superfície imaginária que rodeia o sistema.</p> <p><b>Universo</b> – consiste no sistema mais a vizinhança.</p> <p><b>Sistema isolado</b> – sistema que está envolvido por uma fronteira que não permite nem trocas de matéria nem de energia.</p> <p><b>Sistema fechado</b> – sistema que permite troca de energia mas não de matéria.</p> <p><b>Sistema aberto</b> – sistema que permite trocas de matéria e de energia.</p> <p><b>Entalpia</b> (H) – conteúdo energético de um sistema que sofre transformações a pressão constante (portanto com variação de volume)</p> <p><b>Entropia</b> (S) – estado de desorganização (ou desordem) de um sistema termodinâmico; multiplicada pela temperatura ela dá a medida da quantidade de energia que um sistema não liberta no decurso de uma transformação. A entropia é tanto mais baixa quanto mais organizado for o sistema.</p> <p><b>Energia livre</b> (G) – produz trabalho a temperatura e pressão constantes.</p> <p><b>Energia calorífica</b> – produz trabalho provocando alterações de temperatura ou pressão.</p>
--	---

## Bibliografia

**Campos, L.S.** (2002). *Entender a Bioquímica*, 3ª Ed.. Escolar Editora, Lisboa.

**Smith, C. E Wood, E.J.** (1991). *Energy in biological systems*. Chapman&Hall. London

**Stryer, L., Berg, J. E Tymoczko, J.L.** (2001). *Biochemistry*. 5<sup>th</sup> Ed.. W.H. Freeman and Company, N.Y.